

**Aus der Medizinischen
Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz**

**Weiterführende Untersuchungen zur Identifizierung und
klinischen Relevanz neuer mitochondrialer Antigen-
Antikörper-Systeme bei Patienten mit primärer biliärer
Leberzirrhose**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Stine Daniela Christ
aus Tübingen**

2011

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Klein

2. Berichterstatter:

Professor Dr. S. Stevanovic

3. Berichterstatter:

Professor Dr. U. Spengler

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG: PRIMÄRE BILIÄRE LEBERZIRRHOSE	10
1.1 DEFINITION	10
1.2 HISTORISCHES	10
1.3 DIAGNOSEKRITERIEN	11
1.4 INZIDENZ UND PRÄVALENZ	11
1.5 KLINISCHER VERLAUF	12
1.6 GENETISCHE DISPOSITION, UMWELTEINFLÜSSE UND RISIKOFAKTOREN	15
1.7 THERAPIE UND PROGNOSE	16
1.8 DIE UNTERTEILUNG VON PBC-ERKRANKUNGEN IM KLINISCHEN ALLTAG	17
1.9 DAS VORKOMMEN VON ANA- UND AMA-SPEZIFITÄTEN UND IHRE PROGNOTISCHE BEDEUTUNG	18
1.10 DIE ROLLE VON AMA IN DER ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER PBC	20
1.11 DIE FÜR DIE INDUKTION VON AMA IN FRAGE KOMMENDEN STRUKTUREN; XENOBIOTIKA, BAKTERIEN, VIREN	21
1.12 WEITERE ERKENNTNISSE ÜBER DIE ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE DER PBC	23
1.13 ZIEL DER ARBEIT	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 MATERIALIEN	26
2.1.1 Material	26
2.1.2 Substanzen	27
2.1.3 Geräte	29
2.1.4 Puffer	31
2.1.5 Antikörper	32
2.1.6 Antigene	33
2.2 METHODEN	35
2.2.1 ELISA	35
2.2.2 WesternBlot	36
2.2.3 Proteinbestimmung	37
2.2.4 Antigengewinnung	37

2.2.5	Coomassie-Anfärbung	41
2.2.6	Nickelanfärbung	41
2.2.7	Amido-Black Anfärbung	41
2.2.8	Bandenelution	41
2.2.9	Reduzierung des SDS-Gehaltes in Proteinfractionen	42
2.3	PATIENTEN	43
2.3.1	Patienten mit einer PBC-Erkrankung	43
2.3.2	AIH- Autoimmunhepatitis	45
2.3.3	Kollagenosen	46
2.3.4	Hepatitis C	47
2.3.5	Toxische Lebererkrankungen	47
2.3.6	PSC	48
2.3.7	Kontrollgruppe	48

3. ERGEBNISSE **50**

3.1	DIE DURCH DICHTGRADIENTENZENTRIFUGATION GEWONNENE ANTIGENFRAKTION	
	1.16/1.18	51
3.1.1	Austestung der durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Antigenfraktion 1.16/1.18 im Westernblot	51
3.1.2	Die Antigenfraktion 1.16/ 1.18 im WesternBlot	51
3.1.3	Die Proteinanalyse und ihr Ergebnis	54
3.1.4	Nachweis des Core I Proteins in der Antigenfraktion 1.16/1.18 sowie in der käuflich erworbenen Ubiquinol Cytochrom C- Reduktase	55
3.1.5	Vergleich der Reaktivität eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Serums und eines monoklonalen Anti-Core I Antikörper mit der Antigenfraktion 1.16/1.18	56
3.1.6	Reaktion verschiedener PBC-Patientenserum mit der Antigenfraktion 1.16/1.18 im WesternBlot	57
3.1.7	Reaktion von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen mit der Antigenfraktion 1.16/1.18 im ELISA	59

3.1.8	Antigenfraktion 1.16/1.18: Vergleich der Ergebnisse im WesternBlot und im ELISA.....	61
3.2	DAS REKOMBINANT AUS E.COLI BAKTERIEN GEWONNENE CORE I PROTEIN DER CYTOCHROM C-REDUKTASE.....	62
3.2.1	Austestung des rekombinant gewonnenen Antigens durch Nickelanfärbung.....	62
3.2.2	Inkubation des rekombinant gewonnenen Antigens mit dem Anti-Core I Antikörper.....	62
3.2.3	Das rekombinante Core I Protein im WesternBlot.....	63
3.2.4	Reaktion von Seren von PBC-Patienten mit dem rekombinanten Core I Protein im ELISA.....	66
3.3	VERGLEICH DES ANTIGENS 1.16/1.18 MIT DEM REKOMBINANT GEWONNENEN CORE I PROTEIN.....	66
3.3.1	Antigen 1.16/1.18 im Vergleich zum rekombinanten Core I im WesternBlot.....	66
3.3.2	Antigen 1.16/1.18 im Vergleich zum rekombinant gewonnenen Core I Protein im ELISA.....	67
3.4	DIE KÄUFLICH ERWORBENE CYTOCHROM C-REDUKTASE.....	68
3.4.1	Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase (Sigma) im WesternBlot.....	68
3.4.2	Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase (Sigma) im ELISA.....	69
3.5	DIE UBIQUINOL CYTOCHROM C-REDUKTASE.....	69
3.5.1	Reaktion der käuflich erworbenen, rekombinant gewonnenen Ubiquinol Cytochrom C-Reduktasen (UQCR, UQCRH, UQCRC1, UQCRFS1, UQCRC) mit verschiedenen Patientenseren im WesternBlot.....	69
3.5.2	Reaktion von Seren von Patienten unterschiedlicher Erkrankungen mit der käuflich erworbenen, rekombinant gewonnenen Ubiquinol Cytochrom C-Reduktasen und seiner Untereinheiten (UQCR, UQCRH, UQCRC1, UQCRFS1, UQCRC) im ELISA.....	70

4. DISKUSSION	71
4.1 EINLEITUNG UND BISHERIGER KENNTNISSTAND AUS VORHERGEHENDEN ARBEITEN	71
4.2 DISKUSSION UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE.....	72
4.2.1 Gewinnung des Antigens 1.16/1.18 durch Dichtegradienten-	
zentrifugation.....	72
4.2.2 Nachweis der Cytochrom C-Reduktase in der Antigenfraktion	
1.16/1.18 im WesternBlot.....	73
4.2.3 Die 80 kD Determinante und die in Frage kommenden Antigene .	74
4.2.4 Spezifität und Häufigkeit der Antikörper gegen die 60 und 80 kD	
Determinanten bei der PBC.....	74
4.2.5 Verwendung der Antigenfraktion 1.16/1.18 im ELISA	75
4.2.6 Die in E.coli Bakterien rekombinant exprimierte Cytochrom C-	
Reduktase	75
4.2.7 Verwendung des rekombinant gewonnenen Core I Proteins im	
ELISA.....	76
4.2.8 Vergleich der beiden Antigenfraktionen, die die Cytochrom C-	
Reduktase enthalten (Antigenfraktion 1.16/1.18 und	
rekombinantes Core I Protein).....	76
4.2.9 Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase.....	77
4.2.10 Die käuflich erworbene, rekombinante Ubiquinol Cytochrom C-	
Reduktase	77
4.3 DISKUSSION DER GEWONNENEN ERGEBNISSE IM HINBLICK AUF DIE AKTUELLE	
LITERATUR.....	78
5. ZUSAMMENFASSUNG	82
6. LITERATURVERZEICHNIS	84
7. DANKSAGUNG	92

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

α	alpha
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
AMA	Antimitochondriale Antikörper
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
ARA	American rheumatological association
ATPase	Adenosin-5-triphosphate synthase
Bcl	B-cell lymphoma
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Blutspender
°C	Grad Celsius
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENA	extrahierbare nukleäre Antigene
ERCP	Endoskopisch-retrograde-Cholangio-Pankreaticographie
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMS	Fibromyalgiesyndrom
g	Erdbeschleunigungskonstante
g	Gramm
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
HL-60	Human promyelocytic leukemia cells
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
KBR	Komplementbindungsreaktion

kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB	lysogeny broth
LP	Liver-pancreas antigen
mA	Milliampere
Mio	Millionen
N. Aromaticivorans	Novosphingobium aromaticivorans
nm	Nanometer
p-ANCA	Anti-neutrophilic-cytoplasm antibodies with perinuclear staining
PBC	Primäre biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SLA	Soluble liver antigen
SMA	Smooth muscle antibodies
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethane
UDCA	Ursodesoxycholsäure
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
V	Volt

1. Einleitung: Primäre biliäre Leberzirrhose

1.1 Definition

Die primäre biliäre Leberzirrhose (PBC) ist eine langsam progrediente, chronische Lebererkrankung unklarer Genese, die gehäuft bei Frauen mittleren Alters auftritt. Aufgrund des Nachweises von antimitochondrialen Antikörpern (AMA) in 95 % der Fälle geht man von einer Autoimmunerkrankung aus [27, 34, 49].

Die PBC ist im Frühstadium histologisch gekennzeichnet durch eine Entzündung der kleinen, intrahepatischen Gallengänge, die im weiteren Verlauf zerstört werden. Die dadurch entstandene Störung der Gallensekretion führt zu einem Rückstau der Galle in die Leber und somit zu den weiteren Folgeerkrankungen in Form von fibrotischen Veränderungen und je nach Verlaufsform bis hin zum Endstadium der Zirrhose mit Leberversagen [27, 29].

1.2 Historisches

Im Jahr 1851 wurden von Addison und Gull PBC-ähnliche Symptome in Form von Ikterus, Vitiligo und Xanthomen beobachtet [1]. In den folgenden Jahren konnte festgestellt werden, dass es einen Zusammenhang der Cholestase mit der Leberschädigung gibt, woraufhin Hanot 1876 die Bezeichnung „hypertrophische Zirrhose mit chronischem Ikterus“ einführte [21]. Dieser Begriff hielt sich bis 1949, als man ihn aufgrund des vermehrten Auftretens von xanthomatösen Hautveränderungen durch den Begriff „xanthomatöse biliäre Zirrhose“ ersetzte.

Im Jahre 1959 wurde der bis heute geläufige Name „primäre biliäre Zirrhose“ von Sherlock eingeführt, der aber nicht ganz zutreffend ist, da er nur das Endstadium in Form der Zirrhose erfasst [64]. Jedoch konnte sich der von Rubin geprägte, eher zutreffende Begriff „chronische, nicht-eitrige destruierende Cholangitis“ nicht allgemein durchsetzen [58].

1.3 Diagnosekriterien

Die Diagnose einer PBC-Erkrankung basiert auf 3 Säulen [27]:

- Auftreten von AMA im Serum
- Erhöhung der Leberwerte (vor allem der alkalischen Phosphatase) über mehr als 6 Monate
- Typische histologische Veränderungen in der Leber

Die gesicherte Diagnose erfordert, dass alle 3 Kriterien erfüllt sind. Bei nur zwei erfüllten Kriterien wird ein starker Verdacht hinsichtlich einer PBC-Erkrankung geäußert [27].

1.4 Inzidenz und Prävalenz

Frauen sind in einem Verhältnis von bis zu 10:1 häufiger betroffen als Männer [26, 27, 51, 61]. Das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen liegt zwischen 50 und 55 Jahren. Erkrankungen vor dem 20. Lebensjahr sind keine bekannt und bis zum 25. Lebensjahr sehr selten. Nach oben hin kann keine Altersgrenze festgelegt werden [49].

Genauere Daten über die Inzidenz und Prävalenz sind schwierig zu erfassen. Dies kann durch nach wie vor sehr starke, regionale Unterschiede in der Diagnostik, vor allem der Früherkennung der Erkrankung, erklärt werden. Im Laufe der Jahre wurden die Zahlen für die Inzidenz und Prävalenz der PBC stetig nach oben korrigiert. So wurden in den Jahren zwischen 1974 und 1986 die Inzidenz mit 0,6–13,7 und die Prävalenz mit 23,1–128 Fällen pro 1 Million (Mio) Einwohnern im Jahr angegeben [14, 16, 35, 40]. Laut einer Zusammenfassung neuester Studien liegt die Inzidenz in Nord-Amerika bei 27 und die Prävalenz bei 160–402 Fällen pro 1 Mio Einwohner im Jahr. Aufgrund dieser Ergebnisse schätzt man heutzutage die Inzidenz in der gesamten weißen Bevölkerung auf 3 500 und die Prävalenz auf 47 000 Fälle im Jahr [35].

Es bleibt unklar, ob diese Zunahme der Inzidenz und Prävalenz ein vermehrtes Vorkommen der Krankheit widerspiegelt oder ob dies lediglich auf die

verbesserte Diagnostik zurückzuführen ist, wobei Letzteres angenommen wird [26, 49].

Die regionalen Unterschiede sind aufgrund der oben genannten Problematik der länderspezifischen Diagnostikmöglichkeiten schwierig zu erfassen.

In der Arbeit von Kaplan und Gerswhin [27] wird eine vermehrte Häufigkeit im Norden Europas postuliert. Auch Lazaridis [35] und Parikh-Patel [51] erwähnen in ihren Veröffentlichungen ein Nord-Süd Gefälle, wobei sie darauf hinweisen, dass die Bedingungen in den bisher durchgeführten Studien nicht repräsentativ waren. So muss man das Postulat, dass die PBC in nördlichen Ländern häufiger auftritt, kritisch hinterfragen, denn in genau diesen Ländern hat die PBC-Erkrankung einen sehr hohen Stellenwert und wird sicher auch deswegen öfters diagnostiziert. Des Weiteren wurde in den bisherigen Studien kaum auf die Rahmenbedingungen geachtet, wie z. B. das Rauchen, den Einfluss hormoneller Empfängnisverhütung, Schwangerschaft, Diät etc.

1.5 Klinischer Verlauf

Heutzutage werden 50–60 % [27, 34] der PBC-Erkrankungen bei Patienten in einem asymptomatischen Stadium, meist durch einen Zufallsbefund, diagnostiziert. Dies erklärt sich dadurch, dass die PBC-typischen AMA bereits Jahre vor Eintreten der klinischen Symptomatik nachzuweisen sind [55]. Die PBC-Erkrankung verläuft individuell sehr verschieden. Man kann die Patienten dennoch in zwei Gruppen einteilen: Die sogenannte „High-Risk“-Gruppe, bei der die Krankheit schneller und vor allem bis zum Endstadium fortschreitet und eine sogenannte „Low-Risk“-Gruppe, die durch eine langsame Progression der PBC gekennzeichnet ist, und bei der der Endzustand Zirrhose nicht oder erst nach Jahrzehnten erreicht wird [26, 31]. Auf die prognostischen Faktoren, die eine Zuordnung in die jeweilige Gruppe ermöglichen, wird später eingegangen. Die ersten klinischen Zeichen sind Müdigkeit (21 % der Fälle) und Pruritus (19 % der Fälle) [27]. Der Pruritus kann lokal oder diffus auftreten, meist ist er nachts verstärkt. In manchen Fällen kann er durch Externa wie zum Beispiel

Wolle oder Wärme ausgelöst werden. Der Pruritus ist das Symptom, das von den meisten Patienten als das unangenehmste bezeichnet wird [27]. Die Begleiterscheinung Müdigkeit im Rahmen einer PBC-Erkrankung bleibt nach wie vor ein Rätsel, zumal man keine Korrelation zwischen der Störung der Leber und dem Ausmaß der Müdigkeit ermitteln konnte.

Inzwischen geht man von einer Störung im zentralen Nervensystem aus. Newton et al. [48] versuchten in ihrer Arbeit die These zu verifizieren, dass die Müdigkeit eine Folge einer autonomen Dysfunktion sei, was jedoch nicht gelang.

Bei Blutuntersuchungen der Leber fallen meist eine massive Erhöhung der alkalischen Phosphatase sowie eine Erhöhung der γ -Glutamyl Transferase (γ -GT) auf. Die übrigen Parameter wie Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Bilirubin, Albumin und Prothrombinzeit sind bei Diagnosestellung meist im Normbereich und werden erst in fortgeschrittenen Stadien pathologisch [49].

Auffällig bei der körperlichen Untersuchung von bereits symptomatischen PBC-Patienten sind Hautveränderungen in Form von Hyperpigmentation, „Spider Nävi“ und Xanthelasma (5–10 %) sowie Hepatosplenomegalie in bis zu 70 % der Fälle [27]. Aufgrund der gestörten Gallensekretion kommt es zu einer Malabsorption und infolgedessen zu Osteomalazie sowie Osteoporose.

Weitere schwerwiegende Komplikationen wie zum Beispiel Ösophagusvarizen, Aszites, portale Hypertonie, Splenomegalie, Ikterus oder die hepatische Enzephalopathie treten erst in sehr weit fortgeschrittenen Stadien auf und sind Zeichen dafür, dass die Leberfunktion bereits eingeschränkt ist [27].

Darüber hinaus konnte in weiter fortgeschrittenen Stadien ein erhöhtes Risiko für das hepatozelluläre Karzinom festgestellt werden [49, 66]. Eine Assoziation der PBC mit anderen Autoimmunerkrankungen ist häufig, vor allem mit dem Sjögren-Syndrom, das in bis zu 50–75 % der Fälle auftritt [49, 51]. Aber auch die progressive systemische Sklerose (CREST-Syndrom), der systemische

Lupus erythematoses, die Sklerodermie oder die Thyreoiditis werden in bis zu 10 % nachgewiesen [20].

Histologisch kann man den Verlauf der PBC nach Scheuer [60] in vier Stadien unterteilen:

Stadium 1

Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch eine entzündliche Destruktion der kleinen Gallengänge bis zu einem Durchmesser von 100 µm. Durch die Infiltration von Lymphozyten und wenigen Neutro- und Eosinophilen im Bereich der portalen Trias kommt es zu einer entzündlichen Aufweitung, wobei das umliegende hepatische Gewebe jedoch intakt bleibt. Des Weiteren tritt im Stadium 1 die typische Granulombildung auf, bestehend aus Histozyten, Lymphozyten und gelegentlich Riesenzellen.

Stadium 2

Im Stadium 2 breitet sich die Entzündung auf das umliegende Leberparenchym aus, es kommt zu sogenannten Mottenfraßnekrosen. Ein weiteres Charakteristikum des zweiten Stadiums ist die Abnahme von noch intakten kleinen Gallengängen mit einer gleichzeitig auftretenden Proliferation.

Stadium 3

Das Stadium 3 ist durch fibrotische Veränderungen gekennzeichnet. Lymphozyten sind portal, periportal sowie im Parenchym nachzuweisen.

Stadium 4

Stadium 4 entspricht dem Endstadium der PBC in Form einer Zirrhose.

Die eindeutige histologische Stadieneinteilung ist im klinischen Alltag nicht immer möglich, da die Biopsieproben aus unterschiedlichen Leberregionen unterschiedliche Stadien aufweisen können.

1.6 Genetische Disposition, Umwelteinflüsse und Risikofaktoren

Die Ätiologie der PBC ist nach wie vor unklar. Heutzutage wird allgemein postuliert, dass sowohl eine genetische Disposition als auch Umwelteinflüsse eine große Rolle spielen [32, 49, 52].

Die genetische Disposition konnte mit Hilfe von Zwillings- und Familienstudien nachgewiesen werden. Die Konkordanz bei eineiigen Zwillingen betrug bis zu 63 % [27, 32, 51], die Konkordanz bei Familienangehörigen ersten Grades bis zu 6 % [20, 35]. Auffällig hierbei war, dass vor allem bei weiblichen Familienmitgliedern eine erhöhte Prävalenz von AMA nachzuweisen war: bei Schwestern bis zu 20,7 %, bei Müttern bis zu 15,1 % und bei Töchtern bis zu 9,8 % [34, 35].

Der Einfluss der Umwelt wurde in Studien dokumentiert, die nachwiesen, dass die Häufigkeit der PBC in städtischen Regionen erhöht ist [54]. Des Weiteren konnte in zwei Studien eine erhöhte Inzidenz für die Bevölkerung, die an einem bestimmten Wasserreservoir [2, 51] beziehungsweise an einer Giftmülldeponie lebte [2], nachgewiesen werden.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer PBC-Erkrankung häufiger an Harnwegsinfektionen erkranken, häufiger mit einer Hormontherapie behandelt wurden [20] und dass sie häufiger Nagellackentferner und Haarspray benutzen. Das Rauchen wird inzwischen ebenfalls als Risikofaktor betrachtet, auch wenn man sich den genauen Pathomechanismus bis dato nicht erklären kann. Als mögliche Ursache wird eine Stimulierung der T-Zellen durch den Zigarettenrauch diskutiert [35].

Weitere Einflüsse, die statistisch untersucht wurden, wie zum Beispiel Schwangerschaften, Kontrazeptiva oder vermehrter Alkoholkonsum konnten bisher nicht eindeutig mit einer erhöhten Inzidenz von PBC in Verbindung gebracht werden [35].

1.7 Therapie und Prognose

Aufgrund der bisher geringen Kenntnisse über die Ätiologie der PBC gibt es nach wie vor keine kurative Behandlung. Im Endstadium der Zirrhose ist die Transplantation die einzige Therapieoption.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Gabe von täglich 10–15 mg Ursodesoxycholsäure (UDCA) / kg Körpergewicht in den Stadien 1 und 2 zu einer deutlich verzögerten Progression der Krankheit führt, in fortgeschrittenen Stadien jedoch kaum einen Benefit hat [6, 13, 49]. UDCA ist eine natürlich vorkommende, tertiäre Gallensäure, die auch bei kleinen, röntgennegativen Gallensteinen eingesetzt wird. Bezüglich des genauen Wirkmechanismus gibt es noch Forschungsbedarf. Diesbezüglich werden derzeit mehrere Theorien vorrangig diskutiert [23, 38, 50]:

- Verminderung der Produktion von Gallensäuren
- Immunmodulatorische Effekte
- Veränderung in der Signaltransduktion und des Gallensäuretransportes
- Schutz vor oxidativem Stress

In 20 % der Fälle schlägt UDCA sehr gut an, und es kommt in den folgenden 4–10 Jahren zu keiner Progression der Erkrankung [27]. Die Therapie mit UDCA ist die bisher einzig anerkannte Therapie. Neben dieser gibt es weitere experimentelle Therapie-Möglichkeiten mit Immunsuppressiva oder entzündungshemmenden Medikamenten, die üblicherweise bei Erkrankungen autoimmuner Genese gute Effekte erzielen. Aufgrund eines mangelnden Benefits konnten sich diese jedoch nicht bei der Behandlung von PBC-Erkrankungen etablieren [23, 49].

Neben dem Therapieansatz, die Progression zu verzögern, stellt die symptomatische Behandlung einen weiteren, wichtigen Pfeiler in der Behandlung der PBC dar. Hierzu zählen gegen Pruritus Cholestyramine oder Colestipol (Antihistaminika sind meist unwirksam), gegen das Fortschreiten der Osteoporose

die Gabe von sublimierendem Calcium (1 000–1 500 g), Statine, meist Pravastatin, zur Senkung der Hypercholesterinämie, sowie die Gabe von fettlöslichen Vitaminen zur Verhinderung von Mangelerscheinungen aufgrund der Malabsorption [49, 65].

Aufgrund des individuellen Verlaufes einer PBC-Erkrankung ist es schwierig, eine Prognose zu stellen. Statistisch konnte Lazaridis [35] in seiner Arbeit ermitteln, dass bei asymptomatischen Patienten innerhalb der nächsten 10 Jahre bis zu 46 % an Müdigkeit und Juckreiz und bis zu 17 % an Ikterus leiden. Nur 20 % bleiben symptomfrei. Symptomatische Patienten dagegen entwickeln in 10 bis 20 % der Fälle verglichen zu asymptomatischen Patienten mehr Komplikationen durch portale Hypertension und in 25 % der Fälle kommt es zu einem Leberversagen.

Durch frühzeitige und langfristige Gabe von UDCA in den Stadien 1 und 2 [13, 49] kann die Progression der Erkrankung aufgehalten und somit das Risiko, an einer PBC zu sterben oder eine Transplantation zu benötigen, um 31 % gesenkt werden. [35].

1.8 Die Unterteilung von PBC-Erkrankungen im klinischen Alltag

In jüngster Zeit setzte sich im klinischen Alltag eine Unterteilung der PBC-Erkrankung durch. So wird bei Nachweis von Anti-M2 Antikörpern von einer AMA positiven/Anti-M2 positiven, typischen PBC-Erkrankung gesprochen. Von einer atypischen PBC-Erkrankung dagegen spricht man entweder bei fehlendem Nachweis von Anti-M2 Antikörpern (AMA positiv/Anti-M2 negativ) oder bei fehlendem Nachweis von AMA-Antikörpern (AMA negativ/ANA positiv).

1.9 Das Vorkommen von ANA- und AMA-Spezifitäten und ihre prognostische Bedeutung

Bei den AMA kann man zwischen neun verschiedenen AMA-Untergruppen unterscheiden, (s. Tabelle 1) wobei nur vier davon (M2, M4, M8 und M9) für die PBC von Bedeutung sind [9].

Tabelle 1: Übersicht der AMA-Spezifitäten, ihr Vorkommen und ihre Antigene

AMA-Untereinheit	Assoziierte Erkrankung	Gerichtet gegen
M1	Infektiös, z. B. Syphilis	Cardiolipin
M2	PBC	α -Ketosäure-Deyhydrogenase
M3	Medikamenteninduziert, v. a. bei Venoucuran	unbekannt
M4	PBC	Antigen assoziiert mit Sulfitoxidase
M5	Kollagenerkrankungen, z. B. Lupus erythematodes	unbekannt
M6	Medikamenteninduziert, v. a. bei Iproniazid	Monoaminoxidase
M7	Infektiös, z. B. Myokarditis	FAD-Anteil von Flavoenzymen
M8	PBC	Äußere Mitochondrienmembran
M9	PBC	Glycogen-Phosphorylase

Die für die PBC wichtigste und am häufigsten auftretende Untergruppe der AMA sind die Anti-M2 Antikörper, die sich gegen den in der inneren Mitochondrienmembran gelegenen α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex richten. Das M2-

Antigen gliedert sich wiederum in fünf Untereinheiten auf (M2-a – M2-e) (Tabelle 2):

Tabelle 2: Überblick über die M2-Determinanten und ihre korrespondierenden Enzyme

M2-Determinante	Gerichtet gegen	Molekulargewicht
M2-a	E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	70 kD
M2-b	Protein-E3-bindendes Protein des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	56 kD
M2-c	E2-Untereinheit des α -Ketoglutaratdehydrogenase-Komplexes	51 kD
M2-d	E1 α -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	45 kD
M2-e	E1 β -Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes	36 kD

Von Bedeutung ist vor allem die M2-a Determinante, d.h. die E2-Untereinheit des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes mit dem ca. 80 % der Seren von AMA positiven PBC-Erkrankten reagieren [15], sowie die M2-c Determinante, die von weiteren ca. 10 % der AMA positiven PBC-Seren erkannt wird und sich gegen die α -Ketoglutaratdehydrogenase richtet [25].

In Assoziation mit Anti-M2-Antikörpern können auch Anti-M4- und Anti-M8-Antikörper auftreten, vor allem bei Patienten mit aktiveren Verlaufsformen. Anti-M4 richtet sich gegen Trypsin-insensitive und Anti-M8 gegen Trypsin-sensitive Antigene. Beide können nur im Immunfluoreszenztest oder im ELISA aber nicht im WesternBlot nachgewiesen werden [29].

Anti-M9-Antikörper können unabhängig von Anti-M2-Antikörpern auftreten und reagieren mit einem Antigen der Glykogen-Phosphorylase. Jedoch treten sie

auch bei anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen auf und sind nicht für die PBC spezifisch.

Hinsichtlich der prognostischen Bedeutung der AMA-Untergruppen kann man vier verschiedene AMA-Profile erstellen (s. Tabelle 3). Dabei kann gezeigt werden, dass die Profile C (54 %) und D (96 %) in einem Zeitraum von 6–8 Jahren eine deutliche Progression zu Spätstadien aufweisen, während alle Patienten mit dem Profil A und 96 % der Patienten mit dem Profil B in den Krankheitsstadien 1 und 2 bleiben [9, 30, 31].

Tabelle 3: Die vier verschiedenen AMA-Profile und die zugehörige Antikörperkonstellation

AMA-Profil	Antikörperkonstellation
A	Nur Anti-M9 positiv im ELISA
B	Anti-M9 und/oder Anti-M2 positiv im ELISA
C	Anti-M4, -M4 und/oder -M8 positiv im ELISA (mit oder ohne Anti-M9)
D	Anti-M2, -M4 und/oder -M8 positiv in ELISA und KBR (mit oder ohne Anti-M9)

Neben den AMA können bei bis zu 50 % der Patienten antinukleäre Antikörper (ANA) nachgewiesen werden. Diese reagieren entweder mit einem Fragment des gp-21 Glycoproteins der Kernmembran oder mit Sp 100 (Antikörper gegen „Nuclear Dots“). Sie kommen auch bei AMA negativen PBC-Patienten vor und sind mit einer aktiveren Verlaufsform assoziiert [7, 24, 26, 32, 45].

1.10 Die Rolle von AMA in der Ätiologie und Pathogenese der PBC

Bei der Ätiologie der PBC-Erkrankung geht man davon aus, dass die AMA-Antikörper eine entscheidende Rolle spielen.

AMA treten in 95 % der Fälle auf und sind ein nahezu pathognomonisches Kriterium für die serologische Diagnose [37]. Das frühzeitige Auftreten von AMA in einem asymptomatischen Stadium ließ den Verdacht auf eine autoimmune

Genese entstehen. Hinsichtlich der Pathogenität der AMA gibt es jedoch zwei Ungereimtheiten: Wie kommt es, dass nach Lebertransplantation in nahezu 100 % erneut AMA auftreten, eine erneute PBC-Erkrankung jedoch nur in 10–30 % der Fälle? [22, 38, 47, 61, 69]? Und wie kann man das Auftreten einer PBC-Erkrankung in 5 % der Fälle erklären, in denen keine AMA nachzuweisen sind?

Eine weitere Frage ist, wodurch die AMA, die sich gegen den α -Ketosäuredehydrogenase-Komplex richten, induziert werden. Man nimmt an, dass es sich um eine Kreuzreaktion (Molecular Mimicry) [49, 56, 68] handeln muss (s. oben). Hierfür sind u.a. Bakterien, Viren, Chemikalien und Noxen [10, 56] im Gespräch. Durch eine strukturelle Ähnlichkeit der Pyruvatdehydrogenase und der fremden Struktur (wie z. B. die Zellwand des Bakteriums, Viren oder Xenobiotika) wird die Produktion von B- und T-Zellen stimuliert. Diese B- und T-Zellen richten sich dann gegen die Struktur der Gallengänge und zerstören diese. Für Letzteres spricht das erhöhte Vorkommen von T-Zellen (CD4 und CD8), B-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie von Adhäsionsmolekülen in den Gallengängen [26, 32, 49].

1.11 Die für die Induktion von AMA in Frage kommenden Strukturen; Xenobiotika, Bakterien, Viren

Neben dem Bakterium *E.coli*, das aufgrund der erhöhten Inzidenz von Harnwegsinfektionen bei PBC-Erkrankten in Betracht gezogen wird, ist vor allem *Novosphingobium aromaticivorans* im Gespräch, bei der Ätiologie einer PBC eine Rolle zu spielen [28, 55, 62]. Bei diesem Bakterium handelt es sich um ein gramnegatives, strikt aerobisches Bakterium, das die bisher größte Ähnlichkeit zu dem Haupttarget des AMA, der Pyruvatdehydrogenase PDC-E2 hat. Neben dieser Ähnlichkeit geht man darüber hinaus davon aus, dass das Bakterium Xenobiotika produzieren kann, die eine sehr große Ähnlichkeit zur Lipoylgruppe haben, welche der Teil der Pyruvatdehydrogenase PDC-E2 ist, die die eigentliche chemische Bindung mit den AMA-Antikörpern eingeht

[28]. Aufgrund dieser beiden Fähigkeiten ist das Bakterium *N. aromaticivorans* häufig diskutiert und untersucht worden. So konnte in der Arbeit von Selmi et al. [62] im ELISA eine Antigen-Antikörper Reaktion zwischen Seren von sowohl AMA positiven als auch AMA negativen PBC-Erkrankten mit dem Bakterium *N. aromaticivorans* nachgewiesen werden, während keiner der 100 gesunden Probanden diese aufwies. Außerdem entsprach der im ELISA gemessene Titer gegen *N. aromaticivorans* dem Titer von AMA-M2.

Neben diesem Bakterium wird immer häufiger die Bedeutung von Xenobiotika diskutiert. So wurde in drei Studien die Lipoylgruppe der Pyruvatdehydrogenase mit verschiedenen Xenobiotika ersetzt. Dabei zeigte sich in der Arbeit von Amano et al., dass von den 107 getesteten Xenobiotika 33 eine signifikant höhere IgG-Reaktivität mit Seren von PBC-Patienten aufwiesen als die native, unveränderte Lipoyl-Säure der Pyruvatdehydrogenase [5]. Bei einem der getesteten Xenobiotika, der 2-Octynoic-Säure, fiel darüber hinaus auf, dass es mit denselben Seren und mit derselben Reaktivität reagierte wie die native, unveränderte Lipoylgruppe. In der Arbeit von Long et al. konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden [41]. In seiner Arbeit wurden 18 Xenobiotika getestet, wovon drei ebenfalls deutlich stärker mit Seren von Patienten mit einer PBC-Erkrankung reagierten.

In dem dritten Versuch von Leung et al. [36] stellte man bei dem Xenobiotikum 6-Bromhexoanate fest, dass dies stärker mit Seren von PBC-Patienten reagierte als die native Lipoylgruppe.

Daraufhin wurden Meerschweinchen mit Bromhexoanate immunisiert. Diese Meerschweinchen entwickelten antimitochondriale Antikörper und erkrankten nach circa 18 Monaten an einer autoimmunen Cholangitis. Dies könnte die Theorie bestärken, dass Xenobiotika die Bildung von Antikörpern induzieren und so entscheidend bei der Ätiologie der PBC mitwirken können. Ein weiteres Argument, was für diese Theorie spricht, ist die unterschiedliche Häufung der PBC-Erkrankungen je nach Wohnort (wie z. B. das oben erwähnte häufigere Auftreten an einem Wasserreservoir) oder den verschiedenen Lebensge-

wohnheiten. So ist die oben erwähnte 2-Octynoic-Säure eine sowohl in der Kosmetik, zum Beispiel in Lippenstift oder Parfüm, als auch als Geschmacksstoff häufig genutzte Substanz, was das gehäufte Auftreten von PBC-Erkrankungen bei häufigem Gebrauch dieser Artikel erklären könnte [5]. Aber auch viele der anderen getesteten Xenobiotika finden sich häufig im alltäglichen Leben bzw. in alltäglich genutzten Gegenständen und Mitteln wieder.

1.12 Weitere Erkenntnisse über die Ätiologie und Pathogenese der PBC

Trotz erheblicher Forschung bleibt die Ätiologie der PBC-Erkrankung unklar. Wie oben bereits erwähnt, geht man davon aus, dass es sich um eine Autoimmunerkrankung handelt, bei der die intrahepatischen, biliären Gallengänge nicht mehr als körpereigen betrachtet werden und von T- und B-Zellen angegriffen werden („loss of tolerance“) [55]. Dies könnte durch eine Kreuzreaktion ermöglicht werden. Die im Rahmen eines normalen Abwehrmechanismus gebildeten B- und T-Zellen greifen aufgrund einer Strukturähnlichkeit ihres Antigens mit körpereigenem Gewebe Letzteres an und verursachen im Falle der PBC eine Entzündung mit anschließender Zerstörung der Gallengänge. Warum sich dies bei der PBC nur gegen das Gewebe in den hepatischen Gallengängen richtet, ist ein Rätsel, da die bisher angenommenen, für „Molecular Mimicry“ in Frage kommenden Strukturen in den Mitochondrien und somit überall im Körper vorkommen.

Neben der oben genannten Theorie entwickeln sich neue Ideen hinsichtlich der Ätiologie der PBC. So wird dem Vorgang der Apoptose mehr und mehr Aufmerksamkeit gewidmet, da nachgewiesen werden konnte, dass das Protein bcl-2, das Zellen vor Apoptose schützt, erniedrigt ist [19, 25, 46]. Wie und wodurch die Apoptose erfolgt, ist jedoch noch nicht geklärt. In der Arbeit von Kouromalis et al. [32] und Leung et al. [37] wurde die Rolle von oxidativem Stress in der Bildung von AMA bzw. der Pathogenese von PBC untersucht. Sie zeigten, dass Vitamin E, Retinol, α -Tocopherol, Lutein, Zeaxanthin und andere als anti-Oxidantien bekannte Substanzen bei PBC-Patienten erniedrigt sind.

Des Weiteren konnte in *in-vitro* Studien gezeigt werden, dass das bei PBC verabreichte Medikament UDCA eine schützende Wirkung vor oxidativem Stress hat [42, 50].

Trotz der zahlreichen molekularbiologischen Untersuchungen ist aber auch immer noch nicht geklärt, ob die Anti-M2 Antikörper eine Rolle in der Pathogenese der PBC spielen. Gegen eine solche pathogenetische Rolle dieser Antikörper spricht, dass die PBC auch bei Anti-M2 negativen Patienten vorkommt, dass Anti-M2 Antikörper nachweisbar sein können, ohne dass klinisch/laborchemisch eine PBC vorliegt, oder dass es zahlreiche Antikörper gegen andere Strukturen gibt, wie z.B. gegen nukleäre Proteine. Es ist daher nicht unwahrscheinlich, dass die Anti-M2 Antikörper zwar ein hervorragendes Kriterium sind, aber uns hinsichtlich der Ätiopathogenese der PBC nicht weiterbringen, sondern dass hier andere Faktoren/Autoantigene eine Rolle spielen.

Interessant war daher die Beobachtung, dass es PBC-Patienten gibt, deren Seren zwar im Immunfluoreszenztest eine typische mitochondriale Fluoreszenz zeigen, die aber Anti-M2 negativ sind. Daraus ergab sich die Schlussfolgerung, dass es weitere bisher nicht identifizierte AMA gibt. Dies konnte kürzlich Manon Feuchtinger in ihrer Doktorarbeit belegen [15], in der sie zeigte, dass Seren dieser Patienten im WesternBlot unter Verwendung einer bestimmten mitochondrialen Antigenfraktion zwei Antigendeterminanten bei 80 und 60 kD erkannten. In der 60kD Bande konnten als in Frage kommende Antigene Untereinheiten der F1-ATPase und das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase identifiziert werden. Die Cytochrom C-Reduktase bildet den Komplex III der Atmungskette. Sie gehört zu den Oxidoreduktasen, ist ein Transmembranprotein und besteht aus elf Untereinheiten, darunter zwei Kernproteinen (Core I, II). Sie katalysiert den Elektronentransport von reduziertem Ubichinon oder Coenzym-Q zu Cytochrom C.

1.13 Ziel der Arbeit

Aus den Beobachtungen von Manon Feuchtinger [15] ergaben sich verschiedene Fragestellungen, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen:

1. Verifizierung der 60- und 80 kD-Proteine als PBC-spezifische Antigene
2. Identifizierung von Proteinen/Antigenen in der 80 kD-Bande
3. Analysen hinsichtlich der Bedeutung von Proteinen in der 60 kD-Bande (Core I Protein der Cytochrom C Reduktase und F1-ATPase) als Autoantigene bei der PBC; die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das Core I Protein, die F1-ATPase wurde in einer parallel durchgeführten Arbeit analysiert [53].

Die Identifizierung neuer Antigen-Antikörper Systeme bei der PBC wäre ein großer Fortschritt für die Diagnostik, vor allem bei solchen Patienten, die Anti-M2 negativ sind. Des Weiteren könnten neue Antigen-Antikörper Systeme weiteren Aufschluss hinsichtlich der Ätiologie einer PBC-Erkrankung erbringen.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Material

- Beckman ultra-clear™ Centrifuge Tubes (Beckmann, PaloAlto, CA, USA)
- Blue Max™, 50 ml Polypropylene Conical Tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Chromatography Paper, 3 mm Chr (Whatman®, Maidstone, England)
- Cuvettes (Coulter GmbH, Krefeld)
- Deepwellplatten, Polystyrol 1,2 mm (Wicker GmbH, Kirchheim-Teck)
- epT.I.S.Standard 50-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
- Hybond™ -c-super; supported pure nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Bucks, UK)
- Impfösen Platin/Iridium (neoLab GmbH, Heidelberg)
- Microcentrifuge Tubes (Greiner BioOneGmbH, Frickenhausen)
- Ni-NTA Spin Columns (Qiagen GmbH, Hilden)
- Nunc™ Immunoplate (Nunc™ Brand Products, Roskilde, Dänemark)
- Pasteurpipetten Plastibrand® (Brand GmbH, Wertheim)
- Petrischale 8,5 cm (Greiner BioOneGmbH, Frickenhausen)
- Pipettenspitze Mediware® (Servoprax GmbH, Wesel)
- Röhrchen (Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen)
- Sample Bag (Wallac, Helsinki, Finnland)
- Stripette® Corning 5 ml, 25 ml, 50 ml (Costar NY, USA)

2.1.2 Substanzen

- AEC-(3-Amino-9-Ethylcarbazole-)Tablets (SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Agar (APPLIChem GmbH, Darmstadt)
- Amido Black staining solution (SIGMA[®]-Aldrich GmbH, Steinheim)
- Ammonium persulfate, analytical grade (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Ampicillin-Natriumsalz (Carl-Roth GmbH, Karlsruhe)
- Bio-Beads SM-2 Adsorbent (BIORAD Laboratories, Hercules, Californien)
- BioQuant[®] Protein (MERCK, Darmstadt)
- Bovines Serum Albumin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)
- Bromphenolblau (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Citronensäure-Monohydrat (ROTH, Karlsruhe)
- Coomassie[®] Brilliant Blue G-250 pure (SERVA Biochemics GmbH, Heidelberg)
- Dimethylformamide C₃H₇NO (SERVA-Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Di-Natriumhydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt)
- Essigsäure 100 % (MERCK, Darmstadt)
- Glycin (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe)
- Glycerin Rotipuran[®] (Carlo Roth GmbH, Karlsruhe)

- Urea, 8 M (Merck, Darmstadt)
- Hefeextrakt (APPLIChem GmbH, Darmstadt)
- IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside) (Applichem, Darmstadt)
- Kaliumdihydrogenphosphat (MERCK, Darmstadt)
- Kanamycinsulfat (Applichem GmbH, Darmstadt)
- 2-Mercaptoethanol 99 % p.A. (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Methanol, reinst (MERCK, Darmstadt)
- NaCl (APPLIChem GmbH, Darmstadt)
- Natriumacetat-Trihydrat, reinst (APPLIChem GmbH, Darmstadt)
- Natriumchlorid (MERCK, Darmstadt)
- Natriumhydrogencarbonat (MERCK, Darmstadt)
- Nickel III-Sulfate Hexahydrate (SIGMA[®]-Aldrich GmbH, Steinheim)
- Rotiphorese[®] Gel 40 (Carl ROTH GmbH, Karlsruhe)
- Saccharose, Mikrobiologie (MERCK, Darmstadt)
- Salzsäure 32 % (MERCK, Darmstadt)
- Schwefelsäure 25 % (MERCK, Darmstadt)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (FLUKA BioChemika, Buchs, Schweiz)
- Temed (N, N, N, N-Tetramethylethylendiamide) reinst (SERVA
Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- TRIZMA[®] Base, (Tris [hydroxymethyl]aminomethane), minimum
(SIGMA[®]-Aldrich GmbH, Steinheim)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrate (MERCK, Darmstadt)
- Tris-Cl (10 mM)

- Triton[®] X-100 (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
- Tryptone (APPLIChem GmbH, Darmstadt)
- Tween[®] 20 (MERCK-Schuchardt, Hohenbrunn)
- Wasserstoffperoxid 30 % (Merck, Darmstadt)
- α -Phenylenediaminedihydrochloride (SIGMA[®]-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

2.1.3 Geräte

- 12-Kanal Pipette (Biohit Proline 25-250 μ l)
- 8-Kanal Pippette, Eppendorf Research[®] Pro 50-1200 μ l (Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf)
- Biofuge 15 (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Harz)
- Branson Sonifier 250 (G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd)
- Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau)
- Dampfsterilisator (Varioklav[®], H + P Labortechnik München)
- Diluter, Microlab 500 Series (Hamilton, Reno, Nevada, USA)
- Electro-Eluter Model 422 (BioRad Laboratories GmbH, München)
- Electrophoresis, Power Supply EPS 500/400 (Pharmacia)
- Eletrophoresis Gibco BRL-ST 504 500 V / 400 mA
- ELISA Reader SLT Rainbow (SLT LabInstruments, Österreich);
Software: Magellan (Tecan[®] Trading AG, Switzerland)
- Eppendorf Reference 1-10 μ l, 10-100 μ l, 100 μ l-1000 μ l (Eppendorf, Hamburg)

- Heat Sealer, LKB Wallac 1295-012 (Turku, Finland)
- Hewlett Packard Laser Jet 1100
- HP Scanjet 3800
- Kopierer, Sharp AR-M155
- Light Box, LKB Wallac 1295-013 (Turku, Finland)
- Mini Protean[®] Multi-Casting Chamber (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- Mini Trans-Blot[®] Cell (BioRad, Hercules, CA, USA)
- Papierschneidegerät, EBA 1034
- pH-Meter (Wissenschaftlich-technische Werkstätten)
- Pipetboy (Integra Biosciences, Baar, CH)
- Rüttler für Eppendorfcups Bachofer, Winn, Laboratoriumsgeräte
Reutlingen
- Schüttler (Infors AG, Bottmingen, Schweiz)
- Schüttler SM 25 (Edmund Bühler Laborgerätebau, Tübingen)
- Siemens Laptop, Amilo
- Sorvall-Centrifuge RC-5, Superspeed Refrigerated Centrifuge (Du Pont
Instruments)
- Spectrophotometer Ultraspec 3 (Pharmacia LKB, Freiburg)
- Sterile Werkbank, Hera Safe (Heraeus Instruments, Hanau)
- Ultraschallgerät B-12 und B-250 (Branson, Danbury, Conn., USA)
- Ultrazentrifuge TGA-50 (Kontron[®] Instruments)
- Waage Mettler H 20 T, 0,01-160 g (Mettler-Waagen GmbH, Gießen)
- Waage Sartorius, 5 g-820 g (AG Göttingen)

- Waage Sauter K 1200 (Sauter, Albstadt-Ebingen)
- Wasserbad (Köttermann, Uetze/Hängisen)

2.1.4 Puffer

- Amido Black Anfärbung (0,1 % Amido Black, 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure)
- Ammonium Bicarbonat 50 mM mit 0,1 % SDS
- Bicarbonat-Puffer 0,2 M, pH 9,6 (64 mM Na₂CO₃, 136mM NaHCO₃)
- BSA-Puffer (PBS-Puffer + 3 % BSA [Rinderalbumin])
- Citrat-Puffer 0,1 M, pH 5,0 (80 mM tri-Natriumcitrat, 30 mM Citronensäure)
- Coomassie Blue Entfärber Mittel (10 % Eisessig, 25 % MetOH)
- Coomassie Blue Färbemittel (10 % Eisessig, 25 % MetOH, 0,05 % Coomassie Brilliant Blue R-250)
- Elektrodenpuffer nach Laemmli, pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS)
- ELISA - Substrat (Citratpuffer, pH 5,0 + 0,5 mg/ml Phenylendiamine + 0,03 % Wasserstoffperoxid)
- ELISA- Serumverdünnungspuffer (PBS-Puffer + 0,08 % Triton X 100 + 0,004 mg/ml)
- ELISA Waschpuffer 1 (PBS-Puffer + 0,5 % BSA)
- ELISA Waschpuffer 2 (PBS-Puffer + 0,25 % BSA+ 0,2 % Triton X 100)
- LB Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl)

- LB Agar (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l Agar)
- Mercaptoethanol-Puffer (80 mM Tris (HCl 6,7), 4 % SDS, 10 % Mercaptoethanol, 2 % Glycerol, 0,004 % Bromphenolblau)
- PBS-Puffer, 60 mM, pH 7,4
- PBS-Puffer, pH 7,4 (10 mM KH_2PO_4 , 150 mM NaCl, 63 mM Na_2HPO_4)
- Probenverdünnungspuffer (PBS + 3 % BSA)
- Puffer B (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, pH 8,0)
- Puffer C (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, pH 6,3)
- Puffer E (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea pH 4,5)
- SDS (10 %)
- Substratlösung (0,42 mg/ml AEC, 5,3 % Dimethylformamid, 0,005 % Wasserstoffperoxid)
- Transferpuffer, pH 8,3 (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol)
- Tris, 1 M, pH 6,8 (HCl)
- Tris, 3 M, pH 8,9 (HCl)
- Waschpuffer (PBS- Puffer, 0,05 % BSA, 0,05 % Tween

2.1.5 Antikörper

- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgM / HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG / HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)

- Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins / HRP (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)
- Peroxidase conjugated Affini Pure Goat Anti Human IgG, Fc5 μ fragmented specific (Jackson Immuno Research Laboratories, INC., West Grove, PA, USA)
- Peroxidase conjugated Affini Pure Goat Anti Human IgG Fcy Fragment specific (Jackson, Immuno Research Laboratories INC., West Grove, PA, USA)
- Peroxidase conjugated Affini Pure Goat Anti Human IgM, Fc5 μ fragmented specific (Jackson, Immuno Research Laboratories INC, West Grove, PA, USA)

2.1.6 Antigene

2.1.6.1 Käuflich erworbene, rekombinant gewonnene Antigene

(Expressionssystem: Weizenkeime)

- UQCRC1 (Ubiquinol-Cytochrome C-Reduktase Core Protein 1), ABNOVA® Corporation, Taiwan
- UCRC (Ubiquinol-Cytochrome C-Reduktase complex 7.2 kD) ABNOVA® Corporation, Taiwan
- UQCRH (Ubiquinol-Cytochrome C-Reduktase hinge protein) ABNOVA® Corporation, Taiwan
- UQCRFS1 (Ubiquinol-Cytochrome C-Reduktase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1) ABNOVA® Corporation, Taiwan

2.1.6.2 Käuflich erworbene Antigen-Fraktion

- Cytochrom C-Reduktase (SIGMA[®]-Aldrich GmbH, Steinheim), aus Schweineherz gewonnen

2.2 Methoden

2.2.1 ELISA

2.2.1.1 Vorbereitungen

- Antigene

Die Antigene werden mit Bicarbonat-Puffer so verdünnt, dass eine Soll-Konzentration von 10 µg/ml erreicht wird. Diese Konzentration konnte sich im Routine-Labor für den AMA-Antikörper-Nachweis, insbesondere für M2 sowie für submitochondriale Partikel, etablieren.

- Serumverdünnung

Die Serumverdünnung erfolgt in zwei Schritten. In Eppendorfcups wird das Serum im Verhältnis 1:50 mit Serumverdünnungspuffer verdünnt. In Deepwell-Platten erfolgt die Weiterverdünnung zu einer Endverdünnung von 1:500.

- Antikörper

Die Antikörper-Verdünnungen werden gemäß der Empfehlung des Herstellers (Jackson, Immuno Research Laboratories INC, West Grove, PA, USA) hergestellt. Anti-Human IgG Antikörper werden 1:3000, Anti-Human IgM-Antikörper 1:2000 verdünnt.

2.2.1.2 Beschreibung des Waschvorganges

Die Nunc-Platten werden jeweils viermal in Waschpuffer 1 bzw. 2 gewaschen und nach anschließender circa 15-minütiger Inkubation gut ausgeklopft.

2.2.1.3 Durchführung

Nunc-Platten werden mit 100 µl/„well“ der oben beschriebenen Antigenverdünnung für einen Zeitraum von 14–20 h bei + 4 °C inkubiert. Durch anschließendes Waschen mit dem Waschpuffer 1 (s. Abs. 2.1.4) werden die noch freien Bindungsstellen abgedeckt. Je „well“ werden nun 100 µl Serumverdünnung (wie oben beschrieben) pipettiert und anschließend bei Raumtemperatur 90 Minuten inkubiert.

Nun können pro „well“ 100 µl Peroxidase konjugierte Antikörper (s. oben) pipettiert und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Nach erneutem Waschvorgang werden die eingegangenen Antigen-Antikörper Verbindungen mittels 150 µl Substratlösung pro Loch sichtbar gemacht. Nach circa 10–15 Minuten wird die Reaktion mittels 50 µl einer 25 %-igen Schwefelsäure gestoppt und im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgewertet.

2.2.2 WesternBlot

2.2.2.1 Herstellen von SDS-Gelen für WesternBlot

Für die Elektrophorese werden ein 3,7 %iges Sammelgel und ein 10 %iges Trenngel nach der Methode von Laemmli hergestellt [33]. Nach Auspolymerisation der Gele werden in die jeweiligen Geltaschen bis zu 60 µl Antigen pipettiert (im Verhältnis 1:1 mit Mercaptoethanolpuffer verdünnt und 4 Minuten auf 100 °C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren).

Anschließend werden die Antigene unter Anlegen einer Spannung von bis zu 200 V aufgetrennt.

Die Gele werden entweder mit CoomassieBlue oder Nickel angefärbt, oder für den Transfer auf Nitrocellulosefolien weiterverwendet.

Letzterer wurde nach der sogenannten Sandwichmethode von Towbin durchgeführt [67]. Hierfür legt man das Nitrocellulose-Papier möglichst luftblasenfrei auf das Gel und umgibt dieses beidseits mit drei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren sowie je einem ebenfalls in Transferpuffer getränkten Schwamm.

Der Transfer findet innerhalb 60 Minuten in den dafür vorgesehenen Kammern unter Kühlung, ständigem Rühren sowie dem Anlegen einer Spannung von 100 V statt. Das Antigen enthaltende Nitrozellulose-Papier wird für mindestens drei Stunden bei Raumtemperatur in BSA-Puffer eingelegt.

2.2.2.2 Anfärben der Sheets

Die Sheets werden mit Serum in einer Verdünnung von 1:50 (mit Probenverdünnungspuffer) unter ständigem Schwenken für 45 min inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer und jeweiliger 10-minütiger Inkubation wird der mit Peroxidase konjugierte Anti-Human-Antikörper (200 ml Waschpuffer + 1 ml Anti-Human IgG + 1 ml Anti-Human IgM) dazugegeben und erneut 30 Minuten auf dem Rüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen kann die Substratlösung wie oben beschrieben beigefügt werden. Nach dem Erscheinen von Banden kann die Reaktion mittels 7 %iger Essiglösung gestoppt werden. Die Sheets werden an der Luft getrocknet und anschließend ausgewertet.

2.2.3 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach Bradford [11]. Hierfür wurden 2,5 ml Bioquant-Reagenzlösung mit 0,05 ml Probe in eine Plexiglasküvette gegeben und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert (2,5 ml Bioquant + 0,05 ml destilliertes Wasser) gemessen. Die zur Auswertung nötige Kalibrationskurve wurde freundlicherweise von den Kollegen des Routinelabors angefertigt und erfolgte mittels einer BSA-Verdünnungsreihe.

2.2.4 Antigengewinnung

In dieser Arbeit wurden zwei Antigenfraktionen, die die Cytochrom C-Reduktase enthalten, hergestellt. Zum einen gelang dies durch Sucrose-Dichtegradienten und zum anderen wurde das Antigen rekombinant in E.coli Bakterien gewonnen.

2.2.4.1 Herstellung einer Cytochrom C-Reduktase enthaltenden Fraktion durch Dichtegradientenzentrifugation

Für die Gewinnung einer Cytochrom C-Reduktase enthaltenden Antigenfraktion über Dichtegradientenzentrifugation wurde als Ausgangslösung ein 100 000 g Überstand aus Rinderherzmitochondrien verwendet. Dieser Überstand wurde von Kollegen aus dem Labor streng nach Protokoll hergestellt und mir freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Zur weiteren Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden zehn Saccharose-Lösungen unterschiedlicher Konzentration hergestellt (s. Tab. 4). Davon wurde je 1 ml in ein auf Eis gebettetes Reagenzglas pipettiert. Man fängt mit der höchsten Saccharose-Konzentration an und nachdem die letzte, somit 10 %ige Lösung, an oberster Stelle im Reagenzglas pipettiert wurde, gibt man auf die Saccharosegradienten 2 ml Antigenlösung. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für 24 h in der Ultrazentrifuge bei + 4 °C und 100 000 g. Die Antigene reichern sich je nach spezifischem Gewicht in den verschiedenen Saccharosekonzentrationen an. Nach Abpipettieren der entsprechenden Fraktion (s. Tab. 4) wird das Antigen entweder direkt in Versuchen weiterverarbeitet oder bei -20 °C gelagert.

Tabelle 4: Übersicht über die Saccharose-Gradienten. Die kursiv geschriebenen und fett markierten Zahlen sind die in dieser Arbeit verwendeten Fraktionen.

Spezifisches Gewicht	Gramm pro Liter	Anteil der Saccharose
1,0341	103,8	10 %
1,0810	216,2	20 %
1,0990	263,8	24 %
1,1222	325,4	29 %
1,1415	376,7	33 %
1,1612	429,7	37 %
1,1816	484,5	41 %
1,2025	541,1	45 %
1,2406	645,1	52 %
1,2806	755,6	59 %

2.2.4.2 Rekombinante Herstellung des Core I Proteins der Cytochrom C-Reduktase durch Klonierung

Die rekombinante Herstellung des Core I Proteins der Cytochrom C-Reduktase wurde von Frau Dr. rer. nat. Preuss im Rahmen ihrer Doktorarbeit [53] etabliert und wird im Folgenden nur kurz dargestellt. Die Klonierung des Core I Proteins erfolgt in mehreren Schritten. Plasmid wird aus Bakterien entnommen und auf geeignete Restriktionsstellen geprüft. Im nächsten Schritt wird nach der Methode von Chomoczynski und Sacchi [12] RNA aus Changzellen bzw. HL60-Zellen extrahiert und diese mittels der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mittels PCR nach der Methode von Saiki et al. [59] wird die entsprechende cDNA Sequenz repliziert. Folgende Core I spezifische Primer werden hierfür verwendet:

Vorwärts:

5'-TTAAGGATACCTGTAAGAAAGG-3'

Rückwärts:

5'-GAAGCGCAGCCAGAACATGCC-3'

Als DNA- Polymerasen wurden verwendet:

- proofreading-Polymerase PfuUltra™ high fidelity DNA Polymerase
- SAWADAY Pwo-DNA-Polymerase
- Taq- DNA Polymerase

Die entsprechende Annealing-Temperatur wird jeweils experimentell ermittelt. Das entstandene PCR-Produkt wird aufgereinigt. Um nun eine Ligation des PCR-Produktes mit dem hier verwendeten Vektor pQE-30 UA zu ermöglichen, muss an das PCR Produkt ein 3'-Adenosin Überhang angefügt werden, welcher mit dem U-Überhang am 3'-Ende des Vektors ligieren kann. Die anschließende

Transformation in den E.coli Stamm M15 wurde durch DNA-Sequenzierung der entsprechenden Plasmide verifiziert.

Um das rekombinante Protein zu gewinnen, wurden die Bakterien auf Agarplatten ausgestrichen, gezüchtet und nach Zell-Aufschluß das Protein mit Hilfe von verschiedenen Pufferlösungen aufgereinigt, wie im Folgenden beschrieben:

Die Zubereitung der Agarplatten und des LB-Mediums, sowie die Gewinnung des rekombinanten Proteins erfolgt entsprechend der Anleitung von Qiagen. Hierfür wurde für das LB-Medium 10 g/l Tryptone, 5 g/l Hefe-Extrakt und 10 g/l NaCl in ein Liter destilliertes Wasser gegeben und autoklaviert. Für die Erstellung der Agarplatten gibt man dem LB-Medium 15 g/l Agar hinzu, erhitzt dies, und gießt anschließend die Platten. Die Herstellung der benötigten Pufferlösungen (Puffer B, C, E) wurde bereits in Abs. 2.1.4 erläutert.

Für die Gewinnung des Proteins werden nun von dem bei - 80 °C gelagerten Klon die Bakterien auf Agarplatten mit Ampicillin (100µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei + 37 °C inkubiert. Am folgenden Tag werden 1,5 ml Medium (plus Ampicillin und Kanamycin) mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37 °C unter ständigem Rütteln inkubiert.

Am folgenden Tag werden 500 µl der über Nacht gewachsenen Bakterien in 10 ml Medium gegeben, und solange bei 37 °C inkubiert, bis bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte (OD) von 0,5–0,7 gemessen wird. Durch die Zugabe von 1 M Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) für 4–5 h wird die Proteinexpression induziert. Anschließend wird die oben hergestellte Bakterienkultur eine Minute bei 15 000 g zentrifugiert, um die Zellen zu isolieren.

Der Überstand wird verworfen, die Zellen werden mit Puffer B resuspendiert, und durch Ultraschallbehandlung (6 x 15 sec bursts mit je 15 sec Pausen) aufgeschlossen. Nach der anschließenden Zentrifugation (15 000 x g für 25 min) wird der Überstand auf eine mit Puffer B äquilibrierte Ni-NTA Säule

gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit Puffer C wird das Histidin-markierte Protein in drei Elutionsschritten mit Puffer E gewonnen. Die Eluate werden bei - 20 °C gelagert und in weiteren Versuchen weiterverarbeitet.

2.2.5 Coomassie-Anfärbung

Die Gele werden nach der Gelelektrophorese in CoomassieBlue Lösung über Nacht eingelegt. Am folgenden Tag wird das CoomassieBlue durch Entfärbelösung ersetzt und solange inkubiert, bis das Gel entfärbt ist und die Banden sich gut vom Hintergrund abheben. Bei dieser Methode können Proteine mit einer Konzentration von 0,3–1 µg pro Bande detektiert werden.

Die angefärbten Gele können entweder eingeschweißt und bei + 4 °C gelagert, oder durch die Bandenelution weiterverarbeitet werden.

2.2.6 Nickelanfärbung

Die Sheets werden anstelle eines Serums in Probenverdünnungspuffer inkubiert. Anstatt der Inkubation mit IgM und IgG wird nun das Nickelkonjugat in einem Verhältnis von 1:10 000 (mit Waschpuffer) zugegeben. Der sonstige Verlauf gleicht dem normalen Vorgang bei der Anfärbung von Sheets.

2.2.7 Amido-Black Anfärbung

Die Amido-Black Anfärbung erfolgt gemäß der Anleitung der Firma (SIGMA®-Aldrich GmbH, Steinheim). Die Sheets werden nach der Gelelektrophorese direkt für 10 min in Amido-Black-Lösung (0,1 % Amido-Black, 25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) gelegt und anschließend in Entfärbelösung (25% Isopropanol, 10% Essigsäure) ca. 1 h entfärbt.

2.2.8 Bandenelution

Die Bandenelution wurde mit dem Electro-Eluter Model 422 von BioRad gemäß der von BioRad beigefügten Anleitung durchgeführt.

Die zu eluierende Bande wird ausgeschnitten, in kleine Stücke zerteilt und diese in das Glasröhrchen bis zu einer Höhe von 1 cm gegeben. Das Glasröhrchen wird mit dem volatilen Puffer (s. Abs. 2.1.4) aufgefüllt, ebenso die Apparatur. Durch Anlegen von 8–10 mA/Glastube für zwei bis vier Stunden unter ständigem Rühren wird das gewünschte Antigen aufgereinigt. Durch Auswechseln des Puffers mit reinem Ammoniumpuffer und 1-stündigem Lauf wird versucht, den SDS-Gehalt zu verringern.

Das aufgereinigte Protein, das sich nun in dem sogenannten Membran Cap angereichert hat, kann vorsichtig abpipettiert werden, bei -20 °C gelagert und in weiteren Versuchen verwendet werden.

2.2.9 Reduzierung des SDS-Gehaltes in Proteinfractionen

Durch die Zugabe von Bio-Beads SM-2 Adsorbent der Firma Bio Rad über Nacht bei + 4 °C wird versucht, den SDS-Gehalt der Proteinfraction zu entfernen bzw. zu reduzieren. Am folgenden Tag kann die Proteinfraction vorsichtig abpipettiert und in weiteren Versuchen weiterverarbeitet werden.

2.3 Patienten

2.3.1 Patienten mit einer PBC-Erkrankung

2.3.1.1 PBC-AMA positiv/Anti M2 negativ

Seren von 88 Patienten mit AMA positiver aber Anti-M2 negativer PBC wurden analysiert (Tab. 5 und 6). Seren dieser Patienten sind dadurch gekennzeichnet, dass sie im Immunfluoreszenztest eine typische mitochondriale Struktur ergeben, im ELISA und WesternBlot jedoch keine Reaktion mit den bisher bekannten Antigenen, insbesondere der α -Ketoglutaratdehydrogenase zeigen. Bei 25 der Patienten wurde die Diagnose histologisch verifiziert, bei den restlichen 63 wurde die Diagnose zum einen klinisch, zum anderen serologisch wie oben beschrieben gestellt. Bei sieben Patienten wurde ein Überlappungssyndrom mit einer autoimmunen Hepatitis und bei neun Patienten mit einem toxischen Geschehen diagnostiziert. Seren von 79 Patienten wurden im ELISA und 87 im WesternBlot getestet (s. auch Tab.16). Die Seren stammen überwiegend aus Einsendungen auswärtiger Krankenhäuser oder von niedergelassenen Ärzten.

Alter und Geschlecht der Patienten sind in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 5: Daten von Patienten mit einer PBC-Erkrankung (AMA pos/Anti-M2 neg), histologisch gesichert

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	25	54 J	22–78 J
Frauen	21	55 J	28–78 J
Männer	4	49 J	22–61 J

Tabelle 6: Daten von Patienten mit klinischem Hinweis auf eine PBC-Erkrankung (AMA pos/Anti-M2 neg), histologisch nicht gesichert

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	63	59 J	28–82 J
Frauen	53	60 J	28–79 J
Männer	10	55 J	38–82 J

2.3.1.2 PBC-AMA negativ/ANA positiv

Bei 10 Patienten konnten in allen zur Verfügung stehenden serologischen Diagnosemethoden keine AMA nachgewiesen werden, jedoch waren Seren dieser Patienten positiv für ANA (Antikörper gegen Nuclear dots, gegen Kernmembran sowie gegen Zentromere), die ebenfalls ein Diagnosemarker für eine PBC-Erkrankung sind (24, 29). Zwei der Patienten wiesen ein Überlappungssyndrom mit einer Kollagenose auf. Alter und Geschlecht der Patienten sind in Tab. 7 dargestellt. Alle 10 Seren wurden im ELISA und 7 davon im WesternBlot getestet (s. auch Tab.16).

Tabelle 7: Daten von Patienten mit einer PBC-Erkrankung (AMA neg/ANA pos)

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	10	55 J	36–77 J
Frauen	8	57,2 J	47–77 J
Männer	2	46,5 J	36–57 J

2.3.1.3 PBC-Anti-M2 positiv

Zu dieser Gruppe gehörten 107 Patienten, deren Seren die für die PBC typische Konstellation aufwiesen, d.h. antimitochondriale Antikörper, die sowohl im ELISA als auch im WesternBlot mit dem M2-Antigen reagieren. Alter und

Geschlecht sind in Tabelle 8 aufgeführt. Bei fünf Patienten wurde zusätzlich eine autoimmune Hepatitis, und bei 10 Patienten eine Kollagenose diagnostiziert. Seren von 107 Patienten wurden getestet: 67 davon im ELISA und 74 im WesternBlot (s. auch Tab.16), 20 nur im ELISA, 40 nur im WesternBlot und 30 Seren in beiden Versuchen. Es wurden darüber hinaus noch Seren von drei Patienten im Verlauf getestet.

Die Seren wurden freundlicherweise von Dr. C. Berg, Abteilung 1 der Inneren Medizin, Universitätsklinikum Tübingen, zur Verfügung gestellt oder stammten aus Einsendungen auswärtiger Krankenhäuser beziehungsweise Praxen.

Tabelle 8: Daten von Patienten mit einer PBC-Erkrankung (AMA pos/Anti-M2 pos)

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Altersspanne
Insgesamt	107	55,8 J	25–81 J
Frauen	97	55,7 J	25–81 J
Männer	10	56,2 J	47–75 J

2.3.2 AIH- Autoimmunhepatitis

Diese Patienten (n = 38; Alter und Geschlecht s. Tab. 9) weisen die typische klinisch/biochemische und serologische Konstellation für eine AIH auf. Alle Patienten wiesen einen „Score“ über 15 auf entsprechend den Kriterien der „International AIH-Group“ [4]. Dazu zählt die Transaminasenerhöhung (nach Ausschluss von viralen oder toxischen Ursachen), die erhöhten IgG-Globuline, sowie der Nachweis von Antikörpern gegen Kerne (ANA), glatte Muskulatur (SMA) und Aktin, lösliches Leberantigen/Leber-Pankreas-Antigen (SLA/LP) sowie gegen Mikrosomen der Leber und Niere. Insgesamt wurden Seren von 38 Patienten getestet, 37 davon im ELISA, drei davon im WesternBlot (s. auch Tab.16). Ein Patient wurde im Verlauf beobachtet.

Bei allen Patienten stand die Diagnose einer Autoimmunhepatitis im Vordergrund. Jedoch gab es auch bei diesem Patientenkollektiv mehrere Überlappungssyndrome: fünf Patienten wiesen zusätzlich eine PSC auf, bei sieben Patienten war eine toxische Genese mit zusätzlich aufgefallen und drei Patienten hatten neben der AIH auch noch eine PBC, die jedoch klinisch im Hintergrund stand.

Tabelle 9: Daten von Patienten mit einer Autoimmunhepatitis

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	38	55,6 J.	13-83 J.
Frauen	29	56,1 J.	13-83 J.
Männer	9	54,1 J.	35-69 J.

2.3.3 Kollagenosen

Unter den Kollagenosen werden die Krankheitsbilder Lupus, Sklerodermie, CREST-Syndrom, Sjoergen-Syndrom, SHARP-Syndrom sowie die Dermatomyositis zusammengefasst. Die Patienten waren in der klinischen Untersuchung gemäß den ARA-Kriterien (American Rheumatological Association) [57] auffällig. Serologisch waren die Seren positiv für ANA und zeigten in der Immundiffusion präzipitierende Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA). Auch hier gab es vermehrt Überlappungssyndrome, die jedoch nicht im Einzelnen aufgeführt werden. Insgesamt wurden Seren von 28 Patienten getestet (Tab. 10), davon 27 im ELISA und 4 im WesternBlot (Tab.16). Die Seren wurden freundlicherweise von der rheumatologischen Ambulanz, Abteilung II der Inneren Medizin Tübingen zur Verfügung gestellt oder stammten aus Einsendungen von niedergelassenen Ärzten.

Tabelle 10: Daten von Patienten mit einer Kollagenose

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	28	49,1 J	17–74 J
Frauen	25	49,8 J	17–74 J
Männer	3	43,7 J	22–67 J

2.3.4 Hepatitis C

Seren von 31 Patienten mit einer serologisch gesicherten Hepatitis C (Tab. 11) wurden im ELISA untersucht. Die Seren wurden freundlicherweise von Dr. S. Kaiser, Abteilung I der Inneren Medizin, Universitätsklinikum Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 11: Daten von Patienten mit Hepatitis C

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	31	41,1 J	23–87 J
Frauen	8	47,0 J	24–87 J
Männer	23	39,1 J	23–59 J

2.3.5 Toxische Lebererkrankungen

Seren von 32 Patienten, bei denen eine alkoholtoxische Genese anamnestisch und klinisch gesichert war (Alter und Geschlecht s. Tab. 12), wurden im ELISA untersucht und eines davon ebenfalls im WesternBlot (Tab.16).

Tabelle 12: Daten von Patienten mit einer toxischen Erkrankung

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	32	58,2 J	33–83 J
Frauen	14	61,1 J	38–82 J
Männer	18	55,9 J	33–83 J

2.3.6 PSC

Ferner wurden Seren von 20 PSC-Patienten analysiert (Tab.13). Bei allen Patienten war die Diagnose mittels ERCP gesichert worden, was bislang als der Goldstandard in der Diagnosestellung einer PSC-Erkrankung gilt. Zwölf Seren waren zudem noch p-ANCA positiv. Die Seren wurden freundlicherweise von Dr. C. Berg, Abteilung 1 der Inneren Medizin, Universitätsklinikum Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 13: Daten von Patienten mit einer Primär-Sklerosierenden Cholangitis

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	20	36,5 J	17–50 J
Frauen	9	35,0 J	17–47 J
Männer	11	38,1 J	25–50 J

2.3.7 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 48 Seren von Patienten mit einem gesicherten Fibromyalgie-Syndrom oder mit einem chronischen Erschöpfungssyndrom sowie 20 Seren von gesunden Blutspendern (BSP) (Tab.14, 15). Die Seren wurden freundlicherweise aus der Rheumaambulanz sowie von Frau Prof. Dr. D. Wernet, Institut für Transfusionsmedizin, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 14: Daten von Patienten mit einem Fibromyalgie-Syndrom als Kontrollgruppe

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	48	46,0 J	29–66 J
Frauen	46	46,3 J	29–66 J
Männer	2	38,5 J	37–40 J

Tabelle 15: Daten von gesunden Blutspendern

	Anzahl	Altersdurchschnitt	Alterspanne
Insgesamt	20	41,7 J	20–62 J
Frauen	10	38,1 J	20–62 J
Männer	10	45,3 J	29–62 J

Tabelle 16 gibt nochmals eine Zusammenfassung der Anzahl der in den verschiedenen Methoden (ELISA, Westernblot) getesteten Patientenseren.

Tabelle 16: Übersicht der getesteten Patienten nach Krankheit und nach Versuch

Patienten mit	Anzahl Seren getestet		
	Insgesamt	im ELISA	im Blot
PBC: AMA pos/Anti-M2 neg., histologisch gesichert	25	25	25
histologisch nicht gesichert	63	54	63
PBC, AMA pos/Anti-M2 pos	107	67	74
PBC, AMA neg/ANA pos	10	10	7
Kollagenosen	28	27	4
Hep C	31	31	0
Tox	32	32	1
PSC	20	19	1
AIH	38	37	3
FMS	48	39	15
BSP	20	15	5

3. Ergebnisse

Anbei eine kurze Gliederung über die Darstellung der Ergebnisse:

- **Nachweis des Core I Proteins**
- **Durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnene Antigen 1.16/1.18**
 - Gewinnung und Austestung des Antigens 1.16/1.18
 - Analyse der 80 kD Bande hinsichtlich des in Frage kommenden Antigens durch Massenspektrometrie
 - Inkubation mit Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im WesternBlot (60 kD und 80 kD)
 - Austestung des Antigens im ELISA mit verschiedenen Patientenkollektiven
 - Im Vergleich: WesternBlot und ELISA
- **Das rekombinant in E.coli Bakterien gewonnene Core I Protein**
 - Austestung des Antigens
 - Inkubation mit Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen im WesternBlot (60 und 80 kD Bande)
 - Austestung im ELISA mit verschiedenen Patientenkollektiven
 - Im Vergleich: WesternBlot und ELISA
- **Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase (SIGMA)**
 - Austestung des Antigens im WesternBlot durch Inkubation mit verschiedenen Patientenseren
 - Austestung des Antigens im ELISA
- **Die käuflich erworbene, rekombinant gewonnene Ubiquinol-Cytochrom C-Reduktase (Abnova)**
 - Austestung des Antigens im WesternBlot durch Inkubation mit verschiedenen Patientenseren
 - Austestung des Antigens im ELISA

3.1 Die durch Dichtgradientenzentrifugation gewonnene Antigenfraktion 1.16/1.18

3.1.1 Austestung der durch Dichtgradientenzentrifugation gewonnenen Antigenfraktion 1.16/1.18 im Westernblot

Um zu sehen, in welchen Dichtgradienten sich die Antigene anreichern, die von Seren von Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC erkannt werden, wurden diese im WesternBlot getestet. Die Seren reagierten mit einem Antigen bei ca. 60 kD in der 1.16- und einem Antigen bei ca. 80 kD in der 1.18-Fraktion (Abb. 1). Dieses Ergebnis wurde bereits aus vorhergehenden Arbeiten [15] erwartet.

Nicht bei allen Präparationen war aber eine so scharfe Zuordnung der zwei Determinanten zu den Fraktionen 1.16 bzw. 1.18 möglich, so dass in den folgenden Versuchen beide Fraktionen zu einer Antigenfraktion 1.16/1.18 zusammengefasst wurden.

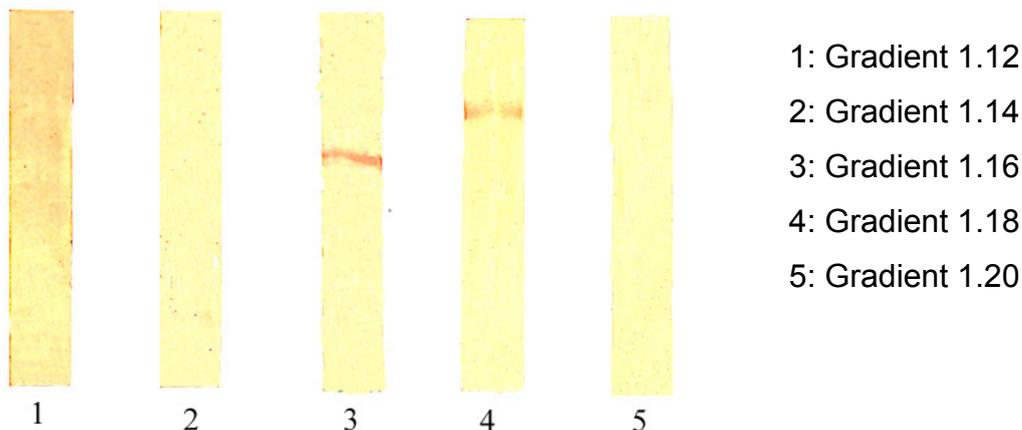


Abb. 1: Austestung der in Dichtgradientenzentrifugation gewonnenen Fraktionen (s. Tab. 4) gegen ein Serum eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten

3.1.2 Die Antigenfraktion 1.16/ 1.18 im WesternBlot

In dieser Arbeit wurde das durch Dichtgradienten gewonnene Antigen 1.16/1.18 gegen mehrere Patientenkollektive getestet. Die Auswertung der

verschiedenen Versuche im WesternBlot stellte sich nicht ganz einfach dar, da die Banden, je nach Versuchsansatz, auf unterschiedlichen Höhen lagen. Um dennoch Rückschlüsse auf das Molekulargewicht ziehen zu können und die Banden trotz verschiedener Versuchsansätze eindeutig als die 60 kD bzw. 80 kD Bande zu detektieren, lief immer ein mit CoomassieBlue angefärbtes Gel mit, bei dem zusätzlich zu dem Antigen 1.16/1.18 ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen war. Die Zuordnung der 60 kD Bande mit dem angefärbten Gel war eindeutig. Bei der 80 kD Bande hingegen traf dies nicht zu, denn zu der Bande im WesternBlot gab es kein eindeutiges Korrelat, d.h. keine eindeutig scharf angefärbte Bande in dem Gel.

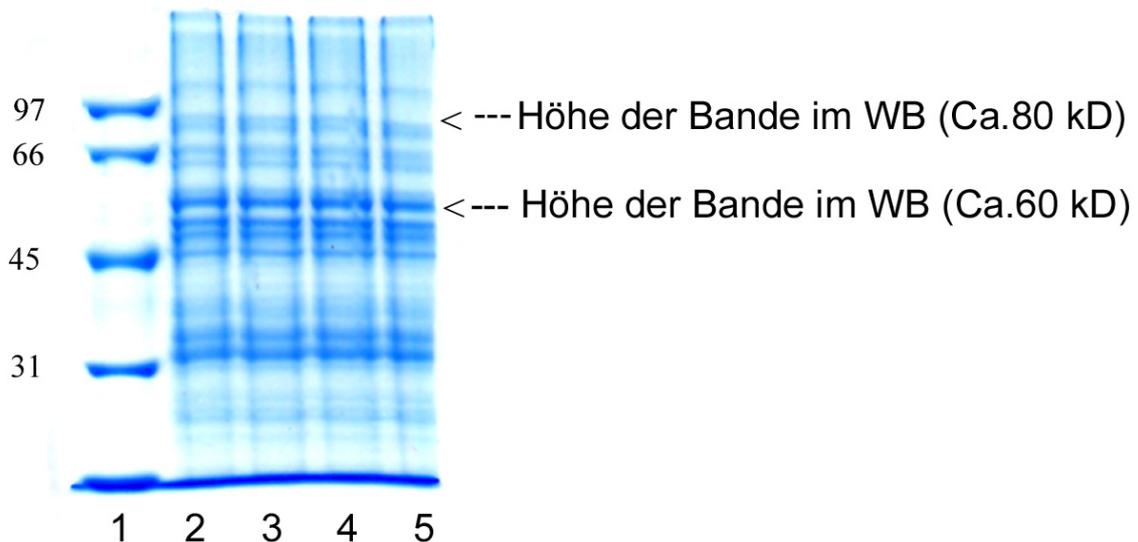


Abb. 2: Vergleich eines Molekulargewichtsmarkers mit dem Antigen 1.16/1.18 und der projizierten Bande auf das mit CoomassieBlue gefärbte Gel
1: Molekulargewichtsmarker, 2-5: Antigen 1.16/1.18

Um dennoch auch bei der 80 kD Bande sicher zu sein, dass das angenommene Molekulargewicht stimmt, wurde der in Abbildung 3 dargestellte Versuch durchgeführt. Hierbei wurde die Reaktion eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Serums mit der bei einem Molekulargewicht von 70 kD liegenden M2-a Bande eines AMA positiven/Anti-M2 positiven Serums verglichen. Wie in

Abbildung 3 gut sichtbar ist, liegt die Bande des AMA positiven/Anti-M2 negativen Serums etwas über der M2 a Bande, weshalb man für diese Bande ein Molekulargewicht von ca. 80 kD angeben kann.

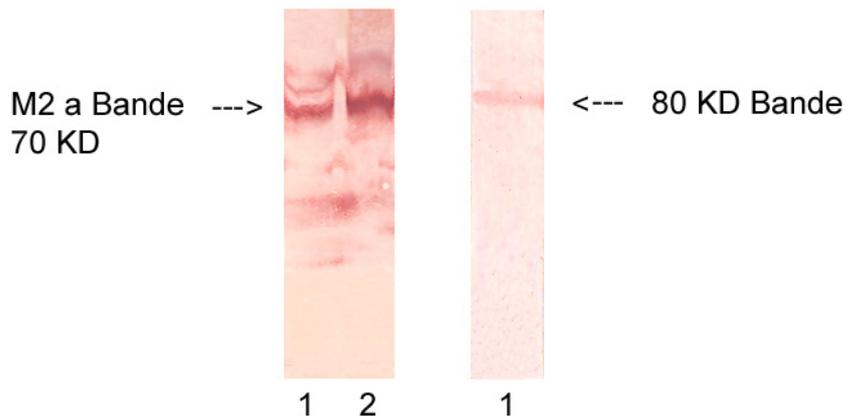


Abb. 3: Vergleich der bekannten M2 a Bande eines Serums eines AMA positiven/Anti-M2 positiven Patienten (1, 2) mit der positiven Bande eines Serums eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten (3);

1: Antigen 1.16/1.18, 2: M2 Antigen aus Rinderherzmitochondrien

Wie bereits oben erwähnt, war in einer früheren Arbeit gezeigt worden, dass die 60 kD Bande die Cytochrom C-Reduktase und F1-ATPase enthält [15]. In der vorherigen Arbeit von Feuchtinger [15] wurde die 60 kD Bande bereits per Massenspektrometrie mehrfach analysiert und erbrachte den Nachweis der Cytochrom C-Reduktase und F1-ATPase. Dies wurde daher in der vorliegenden Arbeit nicht erneut wiederholt.

Um jedoch weitere Hinweise zu bekommen, welches Antigen für die Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD in Frage kommt, wurde die Bande mit CoomassieBlue angefärbt und mit der äquivalenten Bande aus dem WesternBlot verglichen. Da, wie schon oben erwähnt, keine eindeutige Zuordnung der im WesternBlot angefärbten Bande mit denen aus dem CoomassieBlue-Gel gemacht werden konnte, wurden die jeweils etwas höher

liegende Bande 1 (s. Abb. 4) und die etwas tiefer liegende Bande 2 (s. Abb. 4) ausgeschnitten und per Massenspektrometrie (MALDI-TOF) analysiert. Dies wurde freundlicherweise von Oliver Drewes im Interfakultären Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen (Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Stevanovic) durchgeführt.

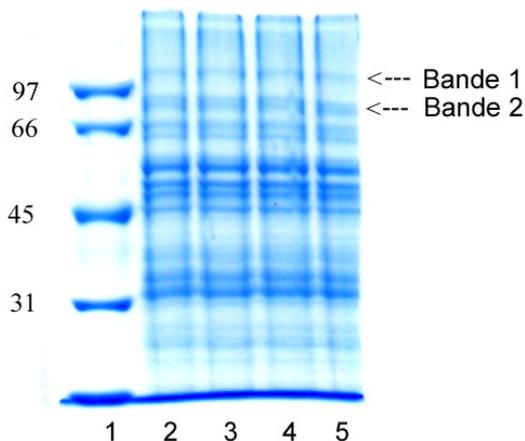


Abb. 4: Darstellung der Banden des Antigens 1.16/1.18, die aus dem mit CoomassieBlue angefärbten Gel ausgeschnitten und eluiert wurden;
1: Molekulargewichtsmarker,
2-5: Antigen 1.16/1.18

3.1.3 Die Proteinanalyse und ihr Ergebnis

- **Bande 1**

Die Bande 1 enthält als Protein Bovines Serum Albumin. Da das Antigen 1.16/1.18 aus dem Überstand von Rinderherzen hergestellt wird, ist es zu erwarten, dass noch Bovines Serum Albumin in dem Antigen 1.16/1.18 enthalten ist. Neben dem Bovinen Serum Albumin konnte in dieser Bande als weiteres Protein die 2-Oxoglutarat Dehydrogenase (Synonym: α -Ketoglutarat Dehydrogenase) nachgewiesen werden, die dem M2 c Antigen entspricht (s. Tab. 2).

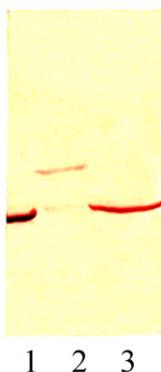
- **Bande 2**

In dieser Bande konnte kein eindeutiges Antigen nachgewiesen werden. Dies kann an einer zu geringen Antigen-Konzentration liegen.

3.1.4 Nachweis des Core I Proteins in der Antigenfraktion 1.16/1.18 sowie in der käuflich erworbenen Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase

Mittels Massenspektrometrie war in einer früheren Arbeit in der 60 kD Determinante der 1.16/1.18 Antigenfraktion das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase identifiziert worden. Im WesternBlot konnte unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gezeigt werden, dass dieser tatsächlich mit der 60 kD Determinante reagiert (Abb.5). Auch mit dem käuflich erworbenen, rekombinant hergestellten Core I Protein der Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase und der ebenfalls käuflich erworbenen Cytochrom C-Reduktase (Sigma) wurde - wie erwartet - eine positive Reaktion bemerkt

Die etwas schwächer auftretende Bande der Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase ist auf die geringere Menge des aufgetragenen Antigens zurückzuführen. Dass die Bande der Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase in Abbildung 5 höher liegt als die Banden der beiden anderen Antigene kann dadurch erklärt werden, dass das Protein rekombinant mit Hilfe einer Kopplung an das GST-Taq hergestellt wurde. Diese Kopplung verursacht ein höheres Molekulargewicht und somit eine kürzere Wegstrecke des Antigens im WesternBlot, d.h. die angefärbte Bande liegt höher im Vergleich zu den Banden der anderen beiden Antigene.



- 1: Fraktion 1.16/1.18
- 2: Antigen Ubiquinol-Cytochrome C-Reduktase
Core Protein 1 (UQCRC1)
- 3: Cytochrom C-Reduktase (Sigma)

Abb. 5: Inkubation der Antigene mit dem Anti-Core I Antikörper

3.1.5 Vergleich der Reaktivität eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Serums und eines monoklonalen Anti-Core I Antikörper mit der Antigenfraktion 1.16/1.18

In einem weiteren Ansatz wurde die Reaktion des Anti-Core I Antikörpers sowie eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patientenserums mit der Antigenfraktion 1.16/1.18 im WesternBlot verglichen. Hierbei zeigte sich (s. Abb.6), dass sowohl der Anti-Core I Antikörper als auch das Patientenserum mit der 60 kD Bande in der 1.16/1.18 Fraktion reagiert.

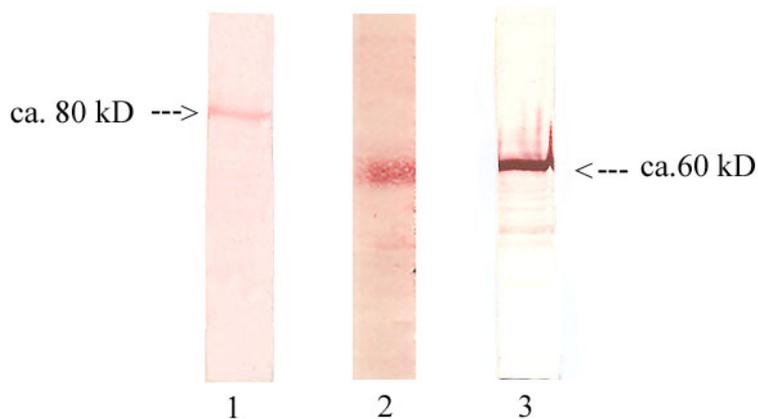


Abb. 6:

- 1: Inkubation der Antigenfraktion 1.16/1.18 mit dem Serum eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten; typische Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD**
- 2: Inkubation der Antigenfraktion 1.16/1.18 mit dem Serum eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten; typische Bande auf der Höhe eines Molekulargewicht von 60 kD**
- 3: Inkubation der Antigenfraktion 1.16/1.18 mit dem Anti-Core I Antikörper**

3.1.6 Reaktion verschiedener PBC-Patientenserum mit der Antigenfraktion 1.16/1.18 im WesternBlot

1) *Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC, (histologisch gesichert)*

Bei 25 der insgesamt 88 AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten wurde die Diagnose PBC histologisch verifiziert. Seren von 11 dieser Patienten (44 %) reagierten mit einer Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 60 kD und 8 Seren (32 %) mit einer Determinante bei 80 kD (Tab.17).

2) *Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC, serologische und klinische Diagnosestellung (keine Histologie vorliegend)*

Bei 63 der AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten wurde die Diagnose der PBC nur klinisch und serologisch gestellt, d.h. eine Histologie war nicht verfügbar. Von diesen Patienten hatten 11 (17 %) Antikörper gegen die 60 kD und 14 (22 %) Antikörper gegen die 80 kD Determinante (Tab.17).

3) *Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 positiver PBC*

Seren von 74 AMA positiven/Anti-M2 positiven Patienten wurden gegen den Gradienten 1.16/1.18 im WesternBlot getestet (Tab.16). Eine Reaktion mit der 80 kD Bande war neben den zusätzlich vorhandenen M2 a und M2 c Banden bei sechs (8 %), mit der 60 kD Bande bei 20 (28 %) zu beobachten (Tab.17).

Zwei Seren reagierten sowohl mit der Bande auf der Höhe von 80 kD als auch mit der 60 kD Determinante.

4) *Patienten mit AMA negativer/ANA positiver PBC*

Sieben PBC-Patienten waren AMA negativ, aber ANA positiv. Ein Serum reagierte mit der 60 - und ein weiteres mit der 80 kD Bande.

5) *Patienten mit anderen Erkrankungen*

Seren von 29 Patienten mit anderen hepatischen und nicht-hepatischen Erkrankungen wurden ebenfalls gegen das Antigen 1.16/1.18 getestet (Tab.16). Zwei (7 %) reagierten mit der 80 kD, 6 (20 %) mit der 60 kD Bande. Seren von gesunden Blutspendern waren negativ (s. Tab. 17).

Tabelle 17: Reaktivität von Seren von Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen mit dem Antigen 1.16/1.18 im WesternBlot

	Anzahl der getesteten Seren	Anzahl der positiven Seren mit dem Antigen 1.16/1.18 bei		
		Nur 80 kD	Nur 60 kD	60 und 80 kD
PBC AMA positiv/Anti-M2 negativ, histologisch gesichert	25	2	5	6
klinisch und serologische Diagnosestellung	63	10	7	4
PBC AMA positiv/Anti-M2 positiv	74	4	18	2
PBC AMA negativ/ANA positiv	7	1	1	0
Autoimmunhepatits	3	1	0	0
Toxische Lebererkrankung	1	0	1	0
Kollagenose	4	1	1	0
PSC	1	0	0	0
Fibromyalgie Syndrom	15	0	4	0
Blutspender	5	0	0	0

3.1.7 Reaktion von Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen mit der Antigenfraktion 1.16/1.18 im ELISA

Patientenserum mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC

Insgesamt wurden 79 AMA positive/Anti-M2 negative Seren von Patienten mit histologisch und/oder klinisch gesicherter PBC gegen das Antigen 1.16/1.18 im ELISA getestet (s. auch Tab.16).

Zwanzig Seren (25 %) hatten Antikörper vom IgM- und neun (11 %) vom IgG-Typ. Bei sieben Seren (9 %) konnten gleichzeitig Antikörper gegen IgM und IgG nachgewiesen werden (Tab. 18). Als positiv wurden diejenigen Seren gewertet, die Werte aufwiesen, die größer als der Mittelwert plus zwei Standardabweichungen von 41 Blutspendern bzw. Patienten mit einem Fibromyalgie-Syndrom waren. Aber auch Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen reagierten mit dem 1.16/1.18 Antigen im ELISA (Tab. 18).

Tab. 18: Übersicht der im ELISA getesteten Seren von Patienten und ihrer Erkrankung

	Anzahl der getesteten Patienten	Anzahl der im ELISA positiv getesteten Patienten gegen		
		Nur IgM	Nur IgG	IgM und IgG
PBC AMA positiv/Anti-M2 negativ				
histologisch gesichert	25	1	2	3
klinische und serologische Diagnosestellung	54	12	0	4
PBC: AMA positiv/Anti-M2 positiv	67	5	10	41
PBC: AMA negativ/ ANA positiv	10	0	0	1
AIH	37	3	7	3
Toxische Lebererkrankung	31	0	0	1
PSC	20	0	0	0
Kollagenose	27	2	1	3
Hepatitis.C	32	0	0	1
Fibromyalgie Syndrom	37	2	2	1
Blutspender	15	1	0	0

3.1.8 Antigenfraktion 1.16/1.18: Vergleich der Ergebnisse im WesternBlot und im ELISA

Durch den ELISA erhoffte man sich eine Screening-Methode, die diejenigen Patienten erfasst, deren Seren mit dem Antigen 1.16/1.18 reagieren und bei denen die Diagnose mittels WesternBlot durch eine positive Bande auf Höhe von 60 kD verifiziert werden kann. Allerdings erwies sich die Korrelation der im ELISA und im WesternBlot positiv getesteten Seren als zu gering (s. Tab. 19).

Insgesamt wurden 78 der insgesamt 88 Seren von Patienten mit einer AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Erkrankung sowohl im WesternBlot als auch im ELISA gegen das Antigen 1.16/1.18 getestet. Dabei wiesen 9 Seren (11 %) ein in beiden Versuchen jeweils positives Ergebnis auf (s. Tab.19). Anhand der Ergebnisse wird deutlich, dass die Korrelation der jeweils positiven Ergebnisse zu gering ist.

Die Korrelation zwischen ELISA und WesternBlot ist nicht zwingend vorauszusetzen, da das Antigen im ELISA anders präsentiert werden kann und somit andere Epitope eine Bindung eingehen können.

Tab. 19: Häufigkeit einer Reaktion von Patienten mit Anti-M2 positiver und negativer PBC mit dem 60 kD Protein im WesternBlot oder ELISA

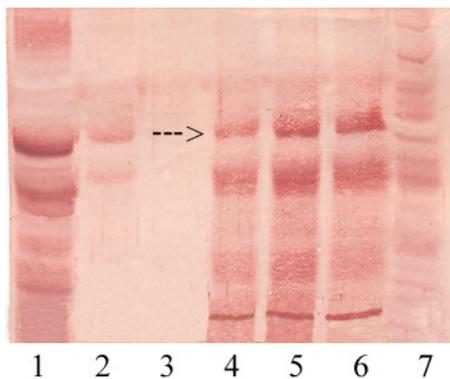
Erkrankung	Nur positiv im		Positiv im
	WesternBlot (60 kD)	ELISA (IgM oder IgG)	WesternBlot und ELISA
AMA pos./Anti-M2 neg.	17	12	9
AMA pos./Anti-M2 pos.	12	48	8
AMA neg./ANA pos.	2	1	0

3.2 Das rekombinant aus E.coli Bakterien gewonnene Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase

3.2.1 Austestung des rekombinant gewonnenen Antigens durch Nickelanfärbung

Um zu sehen, ob der Waschvorgang bzw. die Aufreinigung bei der Gewinnung des rekombinanten Core I Antigens erfolgreich war, wurden die einzelnen Eluate im WesternBlot aufgetragen und mittels eines Nickel-Konjugats angefärbt. Es konnte dabei gezeigt werden, dass sich das Antigen eindeutig aufreinigen ließ und in den Eluaten E1, E2 sowie E3 anreicherte.

Das durch Dichtegradienten gewonnene Antigen 1.16/1.18 wurde zum Vergleich ebenfalls aufgetragen (s. Abb. 7).



- 1) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer B
- 2) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer C1
- 3) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer C2
- 4) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer E1
- 5) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer E2
- 6) Eluat aus dem Waschvorgang mit Puffer E3
- 7) Antigen 1.16/1.18

Abb. 7: Darstellung der verschiedenen Waschschrte mit den jeweiligen Puffern zur Gewinnung des rekombinanten Antigens durch die Anfärbung mit einem Nickelkonjugat (vgl. 2.2.6)

3.2.2 Inkubation des rekombinant gewonnenen Antigens mit dem Anti-Core I Antikörper

Um zu verifizieren, dass das rekombinante Core I Antigen der Cytochrom C-Reduktase in dem Eluat enthalten war, wurde dieses im WesternBlot gegen den monoklonalen Anti-Core I Antikörper inkubiert. Als Positivkontrolle diente das in

Abschnitt 3.1.2 bereits getestete Antigen 1.16/1.18. Wie in Abbildung 8 zu sehen, war bei dem rekombinant hergestellten Antigen eine eindeutig positive Reaktion sichtbar.



Abb. 8: Nachweis von Core I Protein in der
1: rekombinant gewonnenen Antigenfraktion
2: der Antigenfraktion 1.16/1.18
mit Hilfe des monoklonalen Anti Core I Antikörper im
WesternBlot

3.2.3 Das rekombinante Core I Protein im WesternBlot

Analog zum Antigen 1.16/1.18 wurde auch das rekombinant hergestellte Core I Protein gegen Seren von Patienten mit Anti-M2 positiver und negativer PBC im WesternBlot getestet (Tab. 20).

Die Auswertung stellte sich aber schwierig dar, da die Proteinbanden, je nach Versuchsansatz, unterschiedlich weit liefen und trotz Verwendung mehrerer Referenzseren eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Determinante nicht möglich war.

Auffallend war auch, dass das rekombinante Antigen im WesternBlot im Vergleich zu dem Antigen 1.16/1.18 nicht genau auf derselben Höhe reagierte wie die 60 kD oder die 80 kD Bande.

Um zu überprüfen, ob die positiv gewertete Determinante dem Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase entsprach oder lediglich eine unspezifische Reaktion darstellt, wurde auch hier eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt. Hierfür wurde in dem mit CoomassieBlue angefärbtem Gel jeweils eine Bande oberhalb und unterhalb der entsprechenden positiven Bande aus dem WesternBlot (s. Abb. 9) ausgeschnitten, eluiert und erneut im WesternBlot aufgetragen.

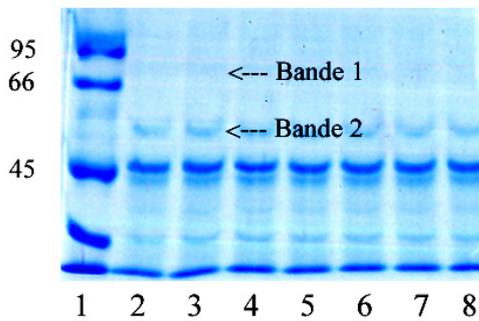


Abb. 9: Anfärbung des rekombinanten Antigens mit CoomassieBlue im Vergleich zu einem Molekulargewichtsmarker;
 1: Molekulargewichtsmarker,
 2-8: rekombinantes Core I Protein

Tab. 20: Übersicht der im WesternBlot mit dem rekombinant gewonnenem Antigen getesteten Seren

	Anzahl der getesteten Seren	Reaktion mit dem rekombinanten Antigen
AMA positiv/Anti-M2 negative PBC	71	21
AMA positiv/Anti-M2 positive PBC	34	7
AMA negativ/ANA positive PBC	7	4
AIH	2	0
Toxische Lebererkrankung	2	1
Kollagenose	3	0
PSC	0	0
Hepatitis	0	0
Fibromyalgie Syndrom	1	0
Blutspender	2	1

Dieses aufgetrennte Antigen wurde daraufhin mit dem Anti-Core I Antikörper inkubiert. Wie oben gezeigt wurde, war mit der gesamten Fraktion ein positiver Nachweis der Cytochrom C-Reduktase (durch Inkubation mit Anti-Core) möglich (Abb. 8). Die aufgetrennte Fraktion jedoch zeigte keine positive Reaktion mit dem Anti-Core I Antikörper, was bedeutet, dass das Core I Protein nicht mehr enthalten ist und daher als Antigen für die positiv gewertete Bande darin nicht in Frage kommen kann. Folglich muss man davon ausgehen, dass die positive Bande unspezifisch ist.

Um diesen Verdacht zu verifizieren, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Hierfür wurden sogenannte K2-Bakterien zu Hilfe genommen. K2-Bakterien sind eine Negativ-Kontrolle bei rekombinant hergestellten Antigenen. Sie unterscheiden sich von der Positivkontrolle darin, dass das eingeschleuste Plasmid kein PCR-Fragment enthält und somit die Bakterien nicht das gewünschte Antigen produzieren können.

Um sicher auszuschließen, dass das K2-Antigen nicht doch das Core I Protein produziert, wurde es im WesternBlot aufgetragen und mit dem monoklonalen Anti-Core I inkubiert. Tatsächlich war keine positive Reaktion mit dem Anti-Core I zu sehen. Im nächsten Schritt wurden nun beide Antigene nebeneinander aufgetragen, zum einen das korrekt hergestellte, rekombinante Antigen und zum anderen die Negativ-Kontrolle mit den K2-Bakterien. Dabei zeigte sich, dass bei beiden Antigenen sich mit Patientenseren auf identischer Höhe mit identischer Intensität Banden anfärben ließen. Dies deutet darauf hin, dass diese Banden eine unspezifische Reaktion mit bakteriellen Verunreinigungen eingehen müssen und nicht in Verbindung mit der Cytochrom C-Reduktase stehen (nicht dargestellt).

3.2.4 Reaktion von Seren von PBC-Patienten mit dem rekombinanten Core I Protein im ELISA

Das von Bakterien exprimierte Core I Protein wurde im ELISA gegen 79 der insgesamt 88 Patienten mit einer AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Erkrankung getestet. Aufgrund des Verdachts einer unspezifischen Reaktion wurde neben dem rekombinant gewonnenen Core I Protein ein anderes rekombinant gewonnenes Antigen, das α -Tubulin, welches ein Antigen bei ZNS Erkrankungen ist und definitiv nicht mit Lebererkrankungen in Verbindung gebracht werden kann, mitgetestet. In diesem Versuch zeigte sich, dass beide Antigene mit denselben Patientenseren mit derselben Intensität positiv reagierten. Daher muss es sich um eine Kreuzreaktion mit bakteriellen Strukturen handeln, die trotz Aufreinigung in dem Eluat neben dem gewünschten Antigen noch vorhanden sind.

Zur Vermeidung dieser Kreuzreaktion wurden, wie in Abschnitt 2.2.8 bereits beschrieben, die in Frage kommenden Banden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und eluiert. Dem Eluat wurden über Nacht Bio-Beads SM-2 Adsorbent der Firma Bio Rad hinzu gegeben, die den SDS-Gehalt des Eluats reduzieren und somit zu weniger unspezifischen Reaktionen führen sollten. Doch trotz Aufreinigung des Antigens kam es weiterhin zu unspezifischen Reaktionen, so dass man den Schluss ziehen muss, dass sich das rekombinant gewonnene Antigen für die Verwendung im ELISA nicht eignet.

3.3 Vergleich des Antigens 1.16/1.18 mit dem rekombinant gewonnenen Core I Protein

3.3.1 Antigen 1.16/1.18 im Vergleich zum rekombinanten Core I im WesternBlot

In Abbildung 10 wurde das selbst hergestellte, rekombinante Core I Protein, das unten näher beschriebene kommerziell erhältliche Antigen UQCRC sowie das Antigen 1.16/1.18 im WesternBlot gegen zwei Seren, die entweder mit dem

rekombinanten Core I Antigen oder mit dem Antigen 1.16/1.18 reagiert haben und im Verhältnis 1:1 gemischt wurden, getestet. Dieser Vergleich zeigt, dass die Reaktion mit dem rekombinant gewonnenen Antigen leicht oberhalb der Bande mit dem Antigen 1.16/1.18 liegt.



Abb. 10: Inkubation des Sheets mit zwei bekannten, gemischten Seren, eines positiv gegen das Antigen 1.16/1.18 und eines positiv gegen das rekombinante Antigen
1: Antigen 1.16/1.18,
2: Antigen UQCRC,
3: rekombinantes Antigen

Unabhängig von diesem Versuch muss man anhand des Vergleichs der durchgeführten WesternBlots mit jeweils dem Antigen 1.16/1.18 und dem rekombinant gewonnenen Antigen feststellen, dass keine Korrelation zwischen diesen beiden Antigenen möglich ist. Die Banden mit dem rekombinanten Antigen waren je nach Versuchsansatz sehr unterschiedlich in der Laufstrecke und es war keine Korrelation hinsichtlich des Molekulargewichts mit dem Antigen 1.16/1.18 zu sehen. Außerdem reagierten die jeweiligen Antigene jeweils mit anderen Patientenseren positiv.

3.3.2 Antigen 1.16/1.18 im Vergleich zum rekombinant gewonnenen Core I Protein im ELISA

Aufgrund des eindeutigen Hinweises der Unspezifität des rekombinanten Antigens im ELISA kann folglich auch keine Korrelation mit den Ergebnissen mit dem Antigen 1.16/1.18 im ELISA erhoben werden.

3.4 Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase

3.4.1 Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase (Sigma) im WesternBlot

Bei Testung von Seren von Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC gegen die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase im WesternBlot ließ sich eine Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von ca. 65 kD anfärben. Diese Reaktion wurde aber auch mit nahezu allen anderen Seren von Patienten mit unterschiedlicher Erkrankungen einschließlich gesunder Blutspender beobachtet, weshalb der Verdacht auf eine unspezifische Reaktion nahe lag. Um diesen Verdacht zu verifizieren, wurden Antigen-haltige Sheets nur mit dem sekundären, Peroxidase konjugierten Antikörper inkubiert, d.h. es wurde kein Serum dazu gegeben. Auch dabei zeigte sich eine Bande auf der Höhe von ca. 65 kD, so dass diese Bande auf eine Bindung mit dem Peroxidase-konjugierten Anti-Human Antikörper zurückzuführen ist (s. Abb. 11).

Aufgrund der Unspezifität wurde deutlich, dass dieses Antigen keine weiteren Erkenntnisse erbringt, und es wurde daraufhin nicht weiter verwendet.

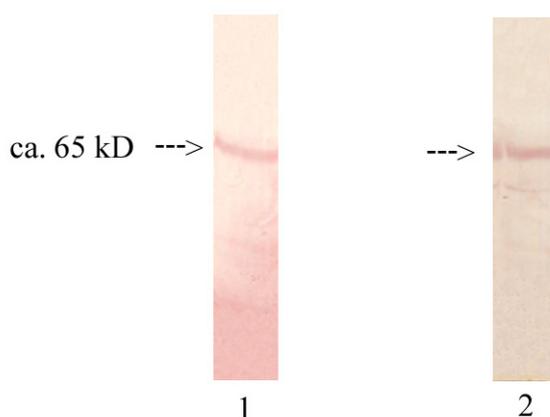


Abb.11:
Reaktion der kommerziellen Cytochrom C-Reduktase mit dem Peroxidase - konjugierten anti- human IgG- und IgM-Antikörper im WesternBlot

Sheet 1: Inkubation nur mit dem Peroxidase-konjugierten Antihuman IgG und IgM-Antikörper;

Sheet 2: Inkubation des Sheets nach WesternBlot mit dem Serum eines AMA positiven/Anti-M2 negativen Patienten

3.4.2 Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase (Sigma) im ELISA

Die Cytochrom C-Reduktase reagierte im ELISA ebenso wie im WesternBlot unspezifisch und wurde nicht weiter verfolgt.

3.5 Die Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase

3.5.1 Reaktion der käuflich erworbenen, rekombinant gewonnenen Ubiquinol Cytochrom C-Reduktasen (UQCR, UQCRH, UQCRC1, UQCRFS1, UQCRC) mit verschiedenen Patientenseren im WesternBlot

Diese Antigene wurden mit Seren von sieben AMA positiven/Anti-M2 negativen, vier AMA positiven/Anti-M2 positiven, einem AMA negativen/ANA positiven PBC-Patienten sowie mit Seren von zwei gesunden Probanden inkubiert. Bei einem Serum eines AMA positiven/Anti-M2 positiven Patienten kann bei der Inkubation mit dem Antigen UQCRC (Ubiquinol-Cytochrom C-Reduktase Core Protein I) eine schwache Bande identifiziert werden (s. Abb. 12). Die übrigen Patienten zeigten keine Reaktion gegen die oben genannten Antigene.

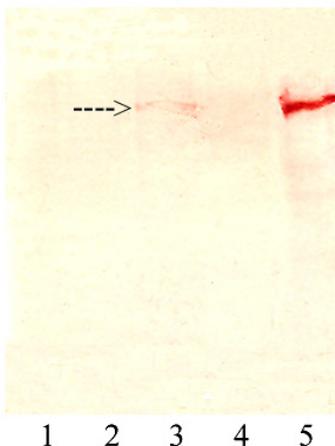


Abb.12: Austestung der verschiedenen Antigene der Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase mit einem AMA positiven/Anti-M2 positiven Serum;

- 1: Ubiquinol-Cytochrom C-Reduktase Komplex,
- 2: Ubiquinol-Cytochrom C-Reduktase hinge Protein,
- 3: Ubiquinol-Cytochrome C Reduktase core Protein I,
- 4: Ubiquinol-Cytochrome C Reduktase, Rieske iron-sulfur Polypeptide,
- 5: 1.16/1.18

3.5.2 Reaktion von Seren von Patienten unterschiedlicher Erkrankungen mit der käuflich erworbenen, rekombinant gewonnenen Ubiquinol Cytochrom C-Reduktasen und seiner Untereinheiten (UQCR, UQCRH, UQCRC1, UQCRFS1, UQCRC) im ELISA

Diejenigen Antigene, die Komponenten der Ubiquinol-Cytochrom C-Reduktase enthalten, wurden auch im ELISA mit 3 Seren von AMA positiven/Anti-M2 positiven und mit 20 Seren von AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Patienten inkubiert. Bei diesem Versuch kam es zu keinen positiven Ergebnissen.

4. Diskussion

4.1 Einleitung und bisheriger Kenntnisstand aus vorhergehenden Arbeiten

Im Routinelabor des Immunpathologischen Instituts Tübingen sind in den vergangenen Jahren vermehrt Patienten aufgefallen, die klinisch eindeutige Hinweise auf eine PBC-Erkrankung zeigten und bei denen auch im Immunfluoreszenztest AMA nachweisbar waren, die aber nicht mit dem PBC-spezifischen M2-Antigen reagierten (sog. AMA positive/Anti-M2 negative Patienten).

Bei diesen Patienten wurden im WesternBlot Reaktionen mit anderen mitochondrialen Proteinen beobachtet, die in einer vorhergehenden Arbeit untersucht wurden [15].

Es zeigte sich, dass Seren dieser Patienten am häufigsten mit einem Antigen reagierten, welches aus dem Überstand von Mitochondrien aus Rinderherz gewonnen wurde. Dieses Antigen wurde daraufhin mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt und gegen Seren von Patienten mit einer AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Erkrankung im WesternBlot getestet. Am häufigsten wurde eine Determinante auf der Höhe eines Molekulargewichts von 60 kD und eine weitere auf Höhe von 80 kD erkannt. Die Analyse der Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 60 kD mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ergab in der vorangegangenen Arbeit, dass es sich bei dem Antigen entweder um die F1-ATPase oder um das Core I Protein des Komplex III der Elektronentransportkette, der Ubichinon Cytochrom C-Reduktase, handelt. Die Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD wurde bisher noch nicht weiter untersucht.

4.2 Diskussion und Interpretation der Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bisher gewonnene Ergebnisse detaillierter zu untersuchen und weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

Der Fokus lag dabei auf folgenden Punkten:

Antigen 1.16/1.18

- Gewinnung des Antigens 1.16/1.18 aus dem Überstand von Mitochondrien aus Rinderherz und anschließender Aufreinigung mittels Dichtegradientenzentrifugation

60 kD Bande:

- Analyse der 60 kD Bande hinsichtlich ihrer Bedeutung als Autoantigen bei der PBC und der als Antigen in Frage kommenden Cytochrom C-Reduktase

80 kD Bande:

- Analyse der 80 kD Bande hinsichtlich ihrer Bedeutung als Autoantigen bei der PBC
- Identifizierung des in Frage kommenden Proteins

Rekombinante Herstellung der Cytochrom C-Reduktase:

- Rekombinante Herstellung der Cytochrom C-Reduktase in E.coli Bakterien, um genaueren Rückschluss zu bekommen, welche Rolle Antikörper gegen die Cytochrom C-Reduktase bei der PBC spielen

4.2.1 Gewinnung des Antigens 1.16/1.18 durch Dichtegradientenzentrifugation

Das aus dem Überstand von Rinderherzmitochondrien gewonnene Antigen wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigt. Die verschiedenen Gradienten wurden, wie in Versuch 3.1.1 dargestellt, gegen Seren von

Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC-Erkrankung inkubiert. Dabei zeigte sich in den anfänglich durchgeführten, mehrfach wiederholten Versuchen, dass sich das gewünschte Antigen in den Fraktionen 1.16 und 1.18 anreichert, während in den weiteren Gradienten (1.12, 1.14, 1.20) kein Antigen von unserem Interesse nachweisbar war, weshalb diese verworfen wurden.

Es stellt sich jedoch im Nachhinein die Frage, ob sich das Antigen 1.16/1.18 dennoch, je nach Versuchsansatz, auch in anderen Fraktionen anreichern kann, und man daher vor jeder Verwendung des neu hergestellten Antigens die einzelnen Fraktionen austesten muss. Dies würde eventuell auch erklären, warum in verschiedenen Versuchsansätzen bei der Inkubation desselben Serums mit dem Antigen 1.16/1.18 sich teils beide Banden anfärben ließen, d.h. eine Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 60 kD, und eine andere auf der Höhe von 80 kD, und sich teils nur eine Bande anfärben ließ.

Was dennoch ungeklärt bleibt, ist die Anfärbung von Banden auf sehr unterschiedlichen Höhen je nach Versuchsansatz, obwohl das Antigen aus demselben Ansatz der Antigengewinnung gewonnen wird. Hier stellt sich die Frage, ob man gegebenenfalls mit einem höherprozentigen SDS-Gel im WesternBlot oder mit längeren Gelen arbeiten muss, um somit eine bessere und damit validere Aussage über die Laufstrecke und das Molekulargewicht treffen zu können.

4.2.2 Nachweis der Cytochrom C-Reduktase in der Antigenfraktion

1.16/1.18 im WesternBlot

Ausgehend von der vorherigen Arbeit von M. Feuchtinger [15], in der die Cytochrom C-Reduktase als mögliches Antigen für die 60 kD Bande diskutiert wurde und daher in dieser Arbeit genauer untersucht werden sollte, wurde jedes Mal vor Verwendung das durch Dichtegradienten gewonnene Antigen im WesternBlot gegen den Anti-Core1-Protein Antikörper getestet und somit verifiziert, dass die Cytochrom C-Reduktase in dem Antigen auch wirklich enthalten ist. Dies war bei allen Versuchsansätzen der Fall.

4.2.3 Die 80 kD Determinante und die in Frage kommenden Antigene

Um weiteren Aufschluss über die 80 kD Bande und das in Frage kommende Antigen zu bekommen, wurden zwei mit CoomassieBlue angefärbte Banden ausgeschnitten, eluiert und mittels Massenspektrometrie untersucht (Abs.: 3.1.3). Diese Analyse ergab jedoch keinen klärenden Hinweis. Bereits die Zuordnung der im WesternBlot positiven Banden mit den durch CoomassieBlue angefärbten Banden in den Gelen war kaum möglich, weshalb die in diesem Molekulargewichtsbereich einzig anfärbbaren Banden knapp oberhalb und knapp unterhalb (verglichen zu der im WesternBlot angefärbten Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD) ausgeschnitten wurden. In diesen Banden wurde jedoch nur das Bovine Serum Albumin nachgewiesen, das aber als Antigen ausgeschlossen werden konnte. Die Identifizierung des Antigens, das in der Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD zu finden ist, steht daher noch aus.

4.2.4 Spezifität und Häufigkeit der Antikörper gegen die 60 und 80 kD Determinanten bei der PBC

In einem weiteren Schritt sollte die Spezifität der Antikörper gegen die 60 und 80 kD Proteine für die PBC analysiert werden. Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen wurden gegen das Antigen 1.16/1.18 getestet und hinsichtlich ihrer Reaktivität mit dieser Bande im WesternBlot analysiert. Dabei zeigte sich, dass 25 % der Seren (22 von insgesamt 88 Patienten) der Patienten mit einer AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Erkrankung mit der 60 kD und ebenfalls 25 % mit der 80 kD Determinante reagierten; aber auch 27 % bzw. 8 % der 74 Patienten mit Anti-M2 positiver PBC hatten Antikörper gegen diese Proteine (Tab. 17)

Allerdings scheinen die Anti-60 und Anti-80 kD Antikörper auch bei Patienten mit anderen Erkrankungen in einem geringen Prozentsatz vorzukommen, die genaue Häufigkeit muss aber noch an größeren Patientenkollektiven evaluiert werden.

4.2.5 Verwendung der Antigenfraktion 1.16/1.18 im ELISA

Die Antigenfraktion 1.16/1.18 wurde auch im ELISA ausgetestet, es ließ sich aber keine Korrelation mit den WesternBlot-Befunden feststellen. Daraus schlossen wir, dass sich diese Antigenfraktion nicht für den Antikörpernachweis im ELISA eignet.

Im ELISA werden die Antigene grundsätzlich anders präsentiert als zum Beispiel im WesternBlot, da auch Konformations-Epitope erkannt werden können. Im WesternBlot dagegen liegen durch die SDS-Behandlung vor allem lineare Epitope vor.

4.2.6 Die in E.coli Bakterien rekombinant exprimierte Cytochrom C-Reduktase

Nachdem die Existenz von Antikörpern gegen ein nicht-M2-assoziiertes 60 kD Protein bei der PBC bestätigt worden war, sollte überprüft werden, ob diese gegen das in dieser Fraktion identifizierte Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase gerichtet sind. Die Cytochrom C-Reduktase wurde daher rekombinant in E.coli Bakterien exprimiert. Nach jeder erneuten Herstellung wurde, äquivalent zu den anderen Antigenen, verifiziert, dass die Cytochrom C-Reduktase auch wirklich in der Antigenfraktion enthalten war. Hierfür wurde, wie in Abbildung 6 dargestellt, das Antigen im WesternBlot gegen den monoklonalen Anti-Core I Antikörper getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sich eine Bande anfärben lässt, die auf derselben Höhe ist wie die 60 kD Bande des mit Anti-Core I Antikörper inkubierten Antigens 1.16/1.18. Dieses rekombinant gewonnene Antigen wurde äquivalent zu dem Antigen 1.16/1.18 im WesternBlot mit mehreren Seren von Patienten mit verschiedenen Erkrankungen inkubiert und ausgewertet. Wie in Abschnitt 3.2.3 bereits erwähnt, stellte sich die Auswertung als nicht einfach dar. Die Banden liefen je nach Versuchsansatz im WesternBlot unterschiedlich weit und waren vom Aussehen her sehr verschieden. Eine eindeutige Molekulargewichtsbestimmung war nicht möglich, da den Banden im WesternBlot keine eindeutige

Bande in den mit CoomassieBlue angefärbten Gelen zugeordnet werden konnte. Die in dieser Arbeit als positiv gewertete Bande liegt im Mittel circa auf der Höhe eines Molekulargewichtsmarkers von 65 kD und ist bei 29,6 % der Patienten nachweisbar. Ob es sich jedoch immer um dieselbe Bande mit dem gleichen Antigen handelt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Unabhängig von dem genauen Molekulargewicht konnte jedoch festgestellt werden, dass mit dem Core I Protein auch Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen reagierten, d.h. es sich nicht um ein PBC-spezifisches Antigen handelte.

4.2.7 Verwendung des rekombinant gewonnenen Core I Proteins im ELISA

Ferner wurde das rekombinant gewonnene Antigen Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase mehrfach im ELISA gegen verschiedene Patientenseren getestet. Dabei konnte, wie aus Abschnitt 3.2.4 ersichtlich, keine Korrelation zwischen ELISA mit WesternBlot- Ergebnissen gesehen werden, da die positiven Ergebnisse im ELISA eindeutig auf unspezifische Reaktionen hindeuten. Gerade bei den rekombinant gewonnenen Antigenen kommt es trotz mehrfachen Reinigungsschritten zur Verunreinigung durch bakterielle Strukturen.

4.2.8 Vergleich der beiden Antigenfraktionen, die die Cytochrom C-Reduktase enthalten (Antigenfraktion 1.16/1.18 und rekombinantes Core I Protein)

- im WesternBlot

Ausgehend von der Annahme, dass in beiden Antigenen dasselbe Antigen enthalten ist, nämlich die Cytochrom C-Reduktase und dies auch das Antigen ist, das eine Antigen-Antikörper Bindung eingeht, erwartet man in den Versuchen eine Korrelation der Ergebnisse trotz unterschiedlicher Antigen Gewinnung. Dies konnte in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Die

Ergebnisse im WesternBlot mit beiden Antigenfraktionen lassen keine signifikante Korrelation erkennen.

- **im ELISA**

Aufgrund des frühzeitigen Verdachtes, dass das rekombinant gewonnene Antigen im ELISA unspezifisch reagiert und dies in dem in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Versuch verifiziert wurde, wurde der ELISA-Ansatz nicht weiter verfolgt und kann somit auch nicht verglichen werden.

4.2.9 Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase

Die käuflich erworbene Cytochrom C-Reduktase wurde ebenfalls mehrfach im ELISA und im WesternBlot getestet. Jedoch muss man auch hier sagen, dass dieses Antigen sowohl im WesternBlot (s. Absch. 3.4.1, ohne Inkubation des Serums kam es trotzdem zu einer positiven Reaktion) als auch im ELISA (positiver Anstieg des Leerwerts, s. Absch. 3.4.2) unspezifisch reagiert. Bei den käuflich erworbenen Antigenen ist dies häufig der Fall, da oft noch sehr starke Verunreinigungen nachzuweisen sind. Dies trifft in diesem Fall sicher zu. Dennoch hätte man für den Fall, dass die Cytochrom C-Reduktase wirklich das entsprechende Antigen ist, erwarten können, dass zusätzlich zu der unspezifischen Reaktion eine weitere und somit im Endeffekt doch noch eine stärkere Reaktion im ELISA nachzuweisen ist bzw. weitere Banden im WesternBlot anzufärben sind. Dies war jedoch nicht der Fall, weshalb man einmal mehr davon ausgehen muss, dass die Cytochrom C-Reduktase nicht als Antigen in Frage kommt.

4.2.10 Die käuflich erworbene, rekombinante Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase

Die käuflich erworbene, rekombinante Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase zeigt im ELISA keine Reaktion mit anti-60 kD positiven Patientenseren und auch im WesternBlot war nur eine sehr schwache Bande mit einem einzelnen Serum

sichtbar. Dies könnte daran liegen, dass die verwendete Menge an Antigen zu gering ist und daher nicht detektiert werden kann. Dagegen spricht allerdings der in Abb. 5 dargestellte Versuch, der zeigt, dass die käuflich erworbene Ubiquinol Cytochrom C-Reduktase mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Core I Protein im WesternBlot sehr deutlich reagiert, trotz eventuell geringem Antigen-Gehalt.

Eine weitere Interpretation (in diesem Falle auch hinsichtlich der bisher gewonnenen Ergebnisse eher wahrscheinlichere Möglichkeit) ist, dass die Cytochrom C-Reduktase nicht, wie anfänglich vermutet, das gesuchte Antigen bei der PBC ist, was auch zu den oben ausgeführten Befunden passen würde.

4.3 Diskussion der gewonnenen Ergebnisse im Hinblick auf die aktuelle Literatur

In der Literatur wird immer wieder diskutiert, ob es in der Tat eine AMA und insbesondere Anti-M2 negative PBC gibt, oder ob diese Antikörper bei den betreffenden Patienten nur aufgrund einer nicht ausreichenden Sensitivität der bisher bekannten Nachweismethoden nicht nachzuweisen sind [44]. Eine neue Studie von Selmi et al. [63] deutet auf die letztere genannte Möglichkeit hin. In ihrer Arbeit konnte durch eine neu entwickelte Nachweismethode bei 20 % der bisher als AMA negativ geltenden PBC-Patienten AMA Antikörper nachgewiesen werden.

In einer weiteren Studie von Liu et al. wurden diese AMA positiven und AMA negativen PBC-Patienten aus klinischer Sicht betrachtet und verglichen [39]. Dabei zeigte sich, dass beide Kollektive klinisch, histologisch und prognostisch identisch waren. Unabhängig von der Behandlung mit Ursodesoxycholsäure wiesen beide Kollektive dieselbe Verlaufsform auf. Auch die Arbeit von Mendes et al. vertritt die zunehmend anerkannte Theorie, dass es sich bei diesen AMA negativen Patienten nicht um ein eigenständiges Patientenkollektiv handelt, sondern dass durch die bisherigen Nachweismethoden nicht alle AMA

Antikörper erfasst werden können [44]. Unsere Beobachtungen legen jedoch nahe, dass nicht nur die Sensitivität der Testmethoden eine Rolle spielt, sondern dass es in der Tat weitere AMA-Spezifitäten neben den Anti-M2 Antikörpern bei der PBC gibt.

Unabhängig von der diagnostischen Spezifität und Sensitivität der AMA ist ihre Bedeutung hinsichtlich der Entstehung einer PBC unklar. Wie in der Einleitung schon angesprochen, gibt es zwei führende Theorien. Zum einen geht man davon aus, dass das 'molecular mimicry' eine große Rolle in der Entstehung der PBC spielt. Hierfür werden nach wie vor Bakterien, Viren, aber auch und vor allem immer häufiger, Xenobiotika diskutiert [5, 36, 41].

Zum anderen wird postuliert, dass neben der Induktion von Antikörpern durch molecular mimicry eine Störung der Apoptose eine weitere Rolle spielen könnte [3, 8]. Indem die für die Apoptose vorgesehenen Zellen nicht ordnungsgemäß zerstört werden, kann es zu einer sekundären Nekrose dieser Zellen mit anschließender Freisetzung zellulärer Strukturen kommen. Diese freigesetzten Zellstrukturen können daraufhin ebenfalls die Bildung von Antikörpern induzieren, die sich dann wiederum auch gegen gesunde Zellen richten können. Zusätzlich gilt aber als erwiesen, dass neben den äußeren Einflüssen auch genetische Dispositionen eine Rolle spielen müssen. Diese Annahme wird durch mehrere Zwillings- und Familienstudien eindeutig belegt (20, 27, 34, 52, 54).

Die bisherigen Arbeiten stellten aber immer die mit der PDH-E2 reagierenden Anti-M2 Antikörper in den Mittelpunkt der Diskussionen. In der vorliegenden Arbeit konnte aber eindeutig belegt werden, dass es PBC-Patienten gibt, die AMA positiv sind, aber keine Anti-M2-Antikörper haben. Insofern ist die ätiopathogenetische Bedeutung der Anti-M2 Antikörper in Frage zu stellen, zumal auch schon lange bekannt ist, dass es AMA-negative PBC Patienten gibt, die aber PBC-spezifische antinukleäre Antikörper besitzen.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich daher darauf, neben dem M2-System weitere Antigen-Antikörper Systeme zu finden. Dadurch erhoffte man sich, zum

einen eine weitere Diagnostikmöglichkeit zu gewinnen, die es ermöglicht, die Anti-M2 negativen Patienten zu detektieren, zum anderen jedoch auch weitere Rückschlüsse auf die Ätiologie der PBC-Erkrankung ziehen zu können. Als Ansatzpunkt für diese Forschung dienten die in dem Routinelabor aufgefallenen Reaktionen im WesternBlot von Anti-M2 negativen Patienten.

In der Literatur ist diesbezüglich, d.h. über die Erforschung neuer Antigen-Antikörper Systeme im WesternBlot, wenig zu finden.

Lediglich Frostell et al. und Mendel-Hartvig et al. berichteten im Jahre 1988 von Reaktionen von PBC-Seren im WesternBlot mit Proteinen mit einem Molekulargewicht von 75 kD, 60 kD, 40 kD sowie einer weiteren, nicht hitzebeständigen Bande bei einem Molekulargewicht von 70 kD [17, 18, 43]. Von diesen Autoren wurden auch die in der vorliegenden Arbeit diskutierten Antigene, d.h. die Cytochrom C-Reduktase und die F1-ATPase, aber auch die bisher nicht diskutierte Succinat-Dehydrogenase als Targetantigene in Erwägung gezogen, was aber in einer anderen Arbeit von Frostell et al. [18] nicht verifiziert werden konnte. Stattdessen wurde in dieser Arbeit die These aufgestellt [18], dass für diese Reaktion das Antigen aus dem Komplex 1 der Atmungskette, der NADH-Reduktase, eine entscheidende Rolle spielt, was sich jedoch ebenfalls nicht bestätigen ließ.

Die in der vorliegenden Arbeit diskutierte und analysierte Bande auf der Höhe eines Molekulargewichts von 80 kD konnte, wie oben schon beschrieben, ebenfalls in dieser Hinsicht keinen weiteren Fortschritt erbringen. Sie konnte zwar als wichtiges Targetantigen bei der AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC bestätigt werden, ihre Spezifität für die PBC muss aber noch in größeren Patientenkollektiven überprüft werden. Auch ist es leider nicht gelungen, relevante Proteine in dieser Bande zu identifizieren, was möglicherweise auf eine zu geringe Konzentration zurückzuführen ist. Dennoch muss man sagen, dass dieser Ansatz, nach weiteren Antigen-Antikörper Systemen zu suchen, vielversprechend ist. Das in der 60 kD Bande identifizierte Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase kann zwar jetzt als Autoantigen bei der PBC durch die

in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, in einer parallel durchgeführten Arbeit wurde aber gezeigt [53], dass das andere in dieser Bande identifizierte Protein, die β -Untereinheit der F1-ATPase doch von 55 % der AMA positiven/Anti-M2 negativen Seren erkannt wird. Bei anderen Lebererkrankungen lag der Nachweis lediglich zwischen 3 % und 31 %. Basierend auf diesen Befunden – bei der F1-ATPase handelt es sich um ein sehr archaisches Antigen – sind jetzt weitere Untersuchungen hinsichtlich der Relevanz dieser Antikörper für Klinik, Prognose und Ätiopathogenese der PBC (Enzyminhibition?) möglich.

5. Zusammenfassung

In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass Seren von Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC mit bisher nicht weiter identifizierten mitochondrialen Proteinen mit einem Molekulargewicht von 60 und 80 kD reagieren. In der 60 kD Antigenfraktion konnte mittels Massenspektrometrie – neben anderen Enzymen - das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase identifiziert werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, zu überprüfen, ob es sich bei diesem Protein tatsächlich um ein Targetantigen von Autoantikörpern bei der PBC handelt. Ferner sollte das 80 kD Protein weiter analysiert werden.

Seren von 88 AMA positiven/Anti-M2 negativen sowie 74 AMA positiven/Anti-M2 positiven PBC-Patienten wurden im WesternBlot und teilweise im ELISA analysiert. Als Kontrollen dienten Seren von Patienten mit anderen Lebererkrankungen und gesunden Blutspendern. Als Antigene dienten eine mittels Sucroседichtegradientenzentrifugation aus Rinderherzmitochondrien isolierte 1.16/1.18 Fraktion sowie eine kommerziell erhältliche Cytochrom C-Reduktase. Ferner wurde das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase rekombinant in *E. coli* exprimiert.

Zweiundzwanzig der 88 AMA positiven/Anti-M2 negativen PBC-Patienten (25 %) reagierten mit der 60 kD Bande in der 1.16/1.18 Fraktion im Westernblot, ebenfalls 25 % mit der 80 kD-Determinante. AMA positiv/Anti-M2 positive Patienten zeigten diese Reaktionen in 27 % bzw. 8 % der Fälle.

Die 80 kD Determinante wurde mittels Elektroelution weiter gereinigt und einer massenspektrometrischen Analyse unterworfen, die aber keine eindeutigen Ergebnisse erbrachte.

Um zu überprüfen, ob die Anti-60 kD Antikörper gegen das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase gerichtet sind, wurden Seren der Patienten mit AMA positiver/Anti-M2 negativer PBC gegen das kommerziell erhältliche Enzym sowie das rekombinant hergestellte Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase

getestet. Es ergaben sich aber keine eindeutigen Reaktionen und insbesondere keine Korrelationen mit den Ergebnissen, die unter Verwendung der 1.16/1.18 Dichtegradientenfaktion erhalten worden waren.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Existenz weiterer bisher nicht identifizierter AMA-Spezifitäten bei Patienten insbesondere mit Anti-M2 negativer aber auch Anti-M2 positiver PBC bestätigt werden. Als Targetantigene der Anti-60 kD Antikörper waren bisher das Core I Protein der Cytochrom C-Reduktase sowie die F1-ATPase diskutiert worden. Das Core I Protein kann jetzt nach den hier präsentierten Befunden mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, eine parallel durchgeführte Arbeit macht aber die Existenz von Antikörpern gegen die F1-ATPase wahrscheinlich. Wie aber der Nachweis von Antikörpern gegen ein 80 kD Protein belegt, muss es noch weitere AMA-Spezifitäten geben, deren Targetantigene noch nicht identifiziert werden konnten. Nachdem die Anti-M2 Antikörper bisher keine eindeutigen Hinweise zur Ätiopathogenese der PBC geliefert haben, eröffnet möglicherweise die Entdeckung weiterer, eventuell auch funktionell aktiver Autoantikörper diesbezüglich neue Aspekte.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Addison, T. and Gull, W. On a certain affection of the Skin-Vitiligoidea-Plana B-Tuberosa. *Guys hospital Reports* 1851; (7):265-77.
- 2) Ala, A., Stanca, C.M., Bu-Ghanim, M., Ahmado, I., Branch, AD., Schiano, TD., Odin, JA., Bach, N.; Increased prevalence of primary biliary cirrhosis near superfund toxic waste sites; *Hepatology* 2006 Mar; 43(3):525-31
- 3) Allina J., Hu B., Sullivan D.M., Fiel M.I., Thung S.N., Bronk S.F., Huebert R.C., van de Water J., LaRusso N.F., Gershwin M.E., Gores G.J., Odin J.A., T cell targeting and phagocytosis of apoptotic biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis, *J Autoimmun.* 2006 Dec;27(4):232-41. Epub 2007 Jan 10
- 4) Alvarez F., Berg P.A., Bianchi F.B., Bianchi L., Burroughs A.K., Cancado E.L., Chapman R.W., Cooksley W.G., Czaja A.J., Desmet V.J., Donaldson P.T., Eddleston A.L., Fainboim L., Heathcote J., Homberg J.C., Hoofnagle J.H., Kakumu S., Krawitt E.L., Mackay I.R., MacSween R.N., Maddrey W.C., Manns M.P., McFarlane I.G., Meyer zum Büschenfelde K.H., Zeniya M., et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis, *J Hepatol.* 1999 Nov;31(5):929-38
- 5) Amano K., Leung P.S., Rieger R., Quan C., Wang X., Marik J., Suen Y.F., Kurth M.J., Nantz M.H., Ansari A.A., Lam K.S., Zeniya M., Matsuura E., Coppel R.L., Gershwin M.E., Chemical xenobiotics and mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis: identification of antibodies against a common environmental, cosmetic and food additive, 2-octynoic acid, *J Immunol.* 2005 May 1;174(9):5874-83
- 6) Angulo, P., Batts, KP., Thernau, TM., Jorgensen, RA., Dickson, ER., Lindor, KD., Long-term ursodeoxycholic acid delays histological progression in primary biliary cirrhosis; *Hepatology* 1999 Mar; 29(3):644-7
- 7) Bauer, A., Habior, A.; Measurement of gp210 autoantibodies in sera of patients with primary biliary cirrhosis; *J. Clin.Lab. Anal.* 2007;21(4):227-31

- 8) Berg C.P., Stein G.M., Keppeler H., Gregor M., Wesselborg S., Lauber K., Apoptosis-associated antigens recognized by autoantibodies in patients with the autoimmune liver disease primary biliary cirrhosis, *Apoptosis*. 2008 Jan;13(1):63-75
- 9) Berg, P.A., Klein, R., Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis and other disorders definition and clinical relevance; *DigDis* 1992;10(2):85-101
- 10) Bogdanos, D.P., Vergani, D., Bacteria and Primary Biliary Cirrhosis, *Clin Rev Allergy Immunol*. 2009 Feb;36(1):30-9
- 11) Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7, 72:248-54
- 12) Chomczynski, P., Sachi, N., The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on, *Nat Protoc*. 2006;1(2):581-5
- 13) Corpechot, C., Carrat, F., Bahr, A., Chrétien, Y., Poupon, R.E., Poupon, R. ; The effect of ursodeoxycholic acid therapy on the natural course of primary biliary cirrhosis ; *Gastroenterology* 2005 Feb; 128(2):297-303
- 14) Eriksson, S., Lindgren, S., The prevalence and clinical spectrum of primary biliary cirrhosis in a defined population, *Scand J Gastroenterol*. 1984 Oct;19(7):971-6
- 15) Feuchtinger, M., Charakterisierung eines neuen Antigen-Antikörper-Systems bei primärer biliärer Zirrhose-Isolierung und Charakterisierung eines 60 kD Antigens aus Überstand von submitochondrialen Partikeln, Promotionsarbeit 2005, Universität Tübingen
- 16) Flisiak, R., Pelszynska, M., Prokopowicz, M., Grygoruk, U.; High concentration of antimitochondrial antibodies predicts progressive primary biliary cirrhosis; *World J Gastroenterol* 2005; 11(36):5706-5709
- 17) Frostell A., Mendel-Hartvig I., Nelson B.D., Tötterman T.H., Björkland A., Ragan, I., Evidence that the major primary biliary cirrhosis-specific mitochondrial autoantigen is a subunit of complex I of the respiratory chain, *Scand J Immunol*. 1988 Aug;28(2):157-65

- 18) Frostell A., Mendel-Hartvig I., Nelson B.D., Tötterman T.H., Björkland A., Ragan I.C., Cleeter M.W., Patel S.D., Mitochondrial autoantigens in primary biliary cirrhosis. Association of disease-specific determinants with a subunit of complex I (NADH-ubiquinone reductase) of the inner mitochondrial membrane, *Scand J Immunol.* 1988 Dec;28(6):645-52
- 19) Gapany, C., Zhao, M., Zimmermann, A., The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts. *Hepatology* 1997 Mar; 26 (3):535-42
- 20) Gershwin, M., Carlo Selmi, Howard J. Worman, Ellen B. Gold, Mitchell Watnik, Jessica Utts, Keith D. Lindor, Marshall M. Kaplan, John M. Vierling, USA PBC Epidemiology Group Risk Factors and Comorbidities in Primary Biliary Cirrhosis A controlled Interview-Based Study of 1032 Patients, *Hepatology.* 2005 Nov;42(5):1194-202
- 21) Hanot, V., Etude sur une forme de cirrhose hypertrophique du foie (cirrhose hypertrophique avec ictère chronique). Paris: J.B. Balliere;1876
- 22) Hashimoto, E., Shimada, M., Noguchi, S., Tanai, M., Tokushige, K., Hayashi, N., Takasaki, K., Fuchinoue, S., Ludwig, J., Disease recurrence after living liver transplantation for primary biliary cirrhosis: a clinical and histological follow-up study, *Liver Transpl.* 2001 Jul;7(7):588-95
- 23) Holtmeier, J., Leuschner, U., Medical Treatment of Primary Biliary Cirrhosis and Primary Sclerosing Cholangitis, *Dig* 2001;64:137-150
- 24) Invernizzi, P., Podda, M., Battezzati, PM., Crosignani, A., Zuin, M., Hitchman, E., Maggioni, M., Meroni, PL., Penner, E., Wesierska-Gadek, J., Autoantibodies against nuclear pore complexes are associated with more active and severe liver disease in primary biliary cirrhosis; *J. Hepatol.* 2001 Mar; 34(3):366-72
- 25) Iwata, M., Harada, K., Kono, N., Kaneko, S., Kobayashi, K, Nakanuma, Y., Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Human pathology* 2000 Feb; 31 (2): 179-84.
- 26) Jones, DE., Pathogenesis of Primary Biliary Cirrhosis, *Clin Liver Dis.* 2008 May;12(2):305-21

- 27) Kaplan, M.M., Gershwin, M.E., Primary Biliary Cirrhosis, N Engl J Med. 2005 Sep 22;353(12):1261-73
- 28) Kaplan, M.M.; Novoshingobium Aromaticivorans A Potential Initiator of Primary Biliary Cirrhosis; Am J Gastroenterol. 2004 Nov;99(11):2147-9
- 29) Klein R., Berg, P.A., Autoantibodies in Chronic Liver Diseases Clinical and diagnostic Relevance; Klin.Lab. 1993;39:611-626
- 30) Klein, R., Klöppel, G., Garbe, W., Fintelmann, V., Berg, PA.; Antimitochondrial antibody profiles determined at early stages of primary biliary cirrhosis differentiate between a benign and a progressive course of the diseases. A retrospective analysis of 76 patients over 6-18 years; J Hepatol. 1991 Jan;12(1):21-7
- 31) Klein, R., Pointner, H., Zilly, W., Glässner-Bittner, B., Breuer, N., Garbe, W., Fintelmann, V., Kalk, JF., Mütting, D., Fischer, R., Tittor, W., Pausch, J., Maier, KP., Berg, PA.; Antimitochondrial antibody profiles in primary biliary cirrhosis distinguish at early stages between a benign and a progressive course a prospective study on 200 patients followed for 10 years; Liver. 1997 Jun;17(3):119-28
- 32) Kouroumalis, E., Notas, G., Pathogenesis of primary biliary cirrhosis, A unifying model; World J Gastroenterol. 2006; 12(15):2320-2327
- 33) Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 1970 Aug 15;227(5259):680-5
- 34) Lazaridis K., Juran, B., Boe, G., Slusser, J., De Andrade, M., Homburger, H., Ghosh, K., Dickson E.R., Lindor, K., Peterson, G.; Increased Prevalence of antimitochondrial Antibodies in First-Degree Relatives of Patients with Primary Biliary Cirrhosis, Hepatology. 2007 Sep;46(3):785-92
- 35) Lazaridis, K., Talwalkar, J. ;Clinical Epidemiology of Primary Biliary Cirrhosis Incidence, Prevalence, and Impact of Therapy, J Clin Gastroenterol. 2007 May-Jun;41(5):494-500
- 36) Leung PS., Park, O., Tsuneyama, K., Kurth, MJ., Lam, KS., Ansari, AA., Coppel, RL., Gershwin, ME.; Induction of primary biliary cirrhosis in guinea pigs following chemical xenobiotic immunization, J Immunol. 2007 Aug 15;179(4):2651-7

- 37) Leung, P.S., Rossaro, L., Davis, P.A., Park, O., Tanaka, A., Kikuchi, K., Miyakawa H., Norman, G.L., Lee, W., Gershwin, M.E.; Antimitochondrial antibodies in acute liver failure Implications for primary biliary cirrhosis; *Hepatology*. 2007 Nov;46(5):1436-42
- 38) Leuschner, U., Primary biliary cirrhosis-presentation and diagnosis, *Clin Liver Dis*. 2003 Nov;7(4):741-58
- 39) Liu, B., Shi, X.H., Zhang, F.C., Zhang, W., Gao, L.X., Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis: a subset of primary biliary cirrhosis, *Liver Int*. 2008 Feb; 28(2):233-9
- 40) Löfgren, J., Järnerot, G., Danielsson, D., Hemdal, I. Incidence and Prevalence of primary biliary cirrhosis in a defined population in Sweden; *Gastroenterol. Scand J Gastroenterol*. 1985 Jun;20(5):647-50
- 41) Long, A.S, Quan, C., Van de Water, J., Nantz, M.H., Kurth, M.J., Barsky, D., Colvin, M.E., Lam, K.S., Coppel, R.L., Ansari, A., Gershwin, M.E., Immunoreactivity of Organic Mimotopes of the E2 Component of Pyruvate Dehydrogenase: Connecting Xenobiotics with Primary Biliary Cirrhosis, *Journal of Immunology*, 2001, 167:2956-2963
- 42) Lukivskaya O, Zavodnik L, Knas M, Buko V. Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification, and antioxidative stress systems in mice, *Adv Med Sci* 2006; 51:54-9
- 43) Mendel- Hartvig, I., Björkland, A., Nelson, B.D., Norberg, R., Ytterström, U., Töttermann, T.H., Primary biliary cirrhosis: Indication for a single mitochondrial antigenic epitope detected by patient autoantibodies and a novel monoclonal antibody, *Scand.J.Immunol*.1988, 28, 403-410
- 44) Mendes, F., Lindor, K.D., Antimitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, *Gastroenterol Clin North Am*. 2008 Jun; 37(2):479-84
- 45) Nakamura, M., Kondo, H., Mori, T., Komori, A., Matsuyama, M., Ito, M., Takii, Y., Yokoyama, T., Migita, K., Daikoku, M., Abiru, S., Yatsuhashi, H., Takezaki, E., Masaki, N., Sugi, K., Honda, K., Adachi, H., Nishi, H., Watanabe, Y., Nakamura, Y., Shimada, M., Komatsu, T., Saito, A., Saoshiro, T., Harada, H., Sodeyama, T., Hayashi, S., Masumoto, A., Sando, T., Yamamoto, T., Sakai, H., Kobayashi, M., Muro, T., Koga, M., Shums, Z., Norman, G.L., Ishibashi, H.; Anti-gp210 and anti-centromere antibodies are different risk factors for the

- progression of primary biliary cirrhosis, *Hepatology*. 2007 Jan;45(1):118-27
- 46) Nakanuma, Y., Tsuneyama, K., Sasaki, M., Harada, K., Destruction of bile ducts in primary biliary cirrhosis, *Gastroenterology* 2000 Aug; 14(4):549-70
- 47) Neuberger, J., Recurrent primary biliary cirrhosis, *Liver Transpl.* 2003 Jun;9(6):539-46
- 48) Newton, J., Hudson, M., Tchtatzis, P., Sutcliffe, K., Pairman, J., Burt, J.A., Jones, D.E.J.; Population Prevalence and Symptom Associations of Autonomic Dysfunction in Primary Biliary Cirrhosis, *Hepatology*. 2007 Jun;45(6):1496-505
- 49) Nishio, A., Keeffe, E.B., Ishibashi, H., Gershwin, E.M.; Diagnosis and treatment of primary biliary cirrhosis, *Clin Exp Med*. 2001 Dec;1(4):165-78
- 50) Okada K, Shoda J, Taguchi K, Maher JM, Ishizaki K, Inoue Y, Ohtsuki M, Goto N, Takeda K, Utsunomiya H, Oda K, Warabi E, Ishii T, Osaka K, Hyodo I, Yamamoto M. Ursodeoxycholic acid stimulates Nrf2-mediated hepatocellular transport, detoxification, and antioxidative stress systems in mice, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008 Oct;295(4):G735-47. Epub 2008 Aug 7
- 51) Parikh-Patel. A., Gold, E., Mackay, I., Gershwin, M.E. The geoepidemiology of Primary Biliary Cirrhosis Contrasts and Comparisons with the Spectrum of Autoimmune Diseases; *Clin Immunol*. 1999 May;91(2):206-18
- 52) Poupon R., Ping C., Chrétien Y., Corpechot C., Chazouillères O., Simon T., Heath S.C., Matsuda F., Poupon R.E., Housset C., Barbu V., Genetic factors of susceptibility and of severity in primary biliary cirrhosis, *J Hepatol*. 2008 Dec;49(6):1038-1045. Epub 2008 Oct 1
- 53) Preuss, B., Identifizierung und Charakterisierung neuer mitochondrialer Antigen/Antikörper-Systeme bei Patienten mit autoimmunen Lebererkrankungen, Promotionsarbeit 2008, Universität Tübingen
- 54) Prince MI, Chetwynd A, Diggle, P., Jarner, M., Metcalf, JV., James, OF. The geographical distribution of primary biliary cirrhosis; *Hepatology*. 2001 Dec;34(6):1083-8

- 55) Reshetnyak VI., Concept on the pathogenesis and treatment of primary biliary cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2006 Dec 7;12(45):7250-62
- 56) Rieger, R., Gershwin, M.E.; The X and Why of Xenobiotics in Primary Biliary Cirrhosis; *J Autoimmun.* 2007; 28(2-3):76-84
- 57) Ropes, M.W., Bennett, G.A., Cobb, S., Jacox, R., Jessar, R.A., Proposed diagnostic criteria for rheumatoid arthritis; report of a study conducted by a committee of the American Rheumatism Association, *J. Chronic Dis.* 1957 Jun;5(6):630-5
- 58) Rubin, E., Schaffner, F. and Popper, H., Primary Biliary Cirrhosis. Chronic Non-Suppurative Destructive Cholangitis. *Am J. Pathol.* 1965, 46:387-407.
- 59) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. 1985. *Biotechnology.* 1992; 24:476-80
- 60) Scheuer, P., Primary Biliary Cirrhosis, *Proc. R. Soc. Med* 1967 Dec; 60(12):1257-1260
- 61) Schreiberman, I., Regev, R., Recurrent Primary Biliary Cirrhosis after Liver Transplantation-The Disease and its management, *MedGenMed.* 2006 May 3;8(2):30
- 62) Selmi, C., Balkwill, D., Invernizzi, P., Ansari, A., Coppel, R., Podda, M., Leung, P., Kenny, T., Van De Water, J., Nantz, M., Kurth, M., Gershwin, M.; Patients with Primary Biliary Cirrhosis React against a Ubiquitous Xenobiotic-Metabolizing Bacterium; *Hepatology.* 2003 Nov;38(5):1250-7
- 63) Selmi, C., Zuin, M., Bowlus, C.L., Gershwin, M.E., Anti-Mitochondrial antibody-negative primary biliary cirrhosis, *Clin Liver Dis.* 2008 Feb; 12(1):173-85
- 64) Sherlock, S. Primary Biliary Cirrhosis, Chronic Intrahepatic obstructive Jaundice, *Gastroenterology* 1959; 37:574-86
- 65) Stojakovic T., Putz-Bankuti C., Fauler, G., Scharnagl, H., Wagner, M., Stadlbauer, V., Gurakugi, G., Stauber, R.E., März, W., Trauner, M.; Atorvastatin in patients with primary biliary cirrhosis and incomplete

- biochemical response to ursodeoxycholic acid; *Hepatology*. 2007 Sep;46(3):776-84
- 66) Suzuki, A., Lymp, J., Donlinger, J., Mendes, F., Angulo, P., Lindor, K., Clinical predictors for hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis; *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2007 Feb;5(2):259-64. Epub 2006 Dec 15
- 67) Towbin H., Staehelin T., Gordon J., Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979 Sep;76(9):4350-4
- 68) Van de Water, J., Turchany, J., Leung, PS., Lake, J., Munoz, S., Surh, CD., Coppel, R., Ansari, A., Nakanuma, Y., Gershwin, ME, Molecular Mimicry in primary biliary cirrhosis. Evidence for biliary epithelial expression of a molecule cross-reactive with pyruvate dehydrogenase complex -E2, *J Clin Invest* 1993 Jun;91(6):2653-64
- 69) Williams, R., Gershwin, M.E., How, why, and when does Primary biliary Cirrhosis recur after liver transplantation? *Liv Trans* 2007 13:1214-1216

7. Danksagung

Mein größter Dank geht an dieser Stelle an Frau Prof. Klein, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht hat und mir stets mit Rat und Tat beiseite stand. Durch ihren Optimismus, ihre freundliche Art, ihren Humor, aber insbesondere durch ihr enormes fachliches Wissen und die unendliche Geduld mit uns Doktoranden konnte ich jede Schwierigkeiten erfolgreich hinter mich bringen und möchte hierfür meinen zutiefsten Dank aussprechen. Des Weiteren möchte ich einen ebenso herzlichen Dank an das Labor aussprechen, das mit viel Hilfsbereitschaft und Geduld immer zur Seite stand. Trotz der teils mürben Laborarbeit durfte ich in diesem Labor schöne Zeiten verbringen und sehr freundliche Kollegen kennen lernen. Ein besonderer Dank geht an Elwira Herdt, die mich in den ELISA und WesternBlots eingelernt hat. Weiterhin danke ich Beate Preuss für die zur Verfügung gestellten Materialien, den neuen Gedankenansätzen sowie der hilfsbereiten Unterstützung bei neuen Versuchen. Ein weiterer Dank geht an Manon Feuchtinger für die von ihr gewonnenen und zur Verfügung gestellten Daten.

Bei dieser Gelegenheit möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern für alles bedanken, was sie bisher für mich getan haben. Bis zu dieser Dissertation war es ein weiter Weg. Sie waren stets für mich da und haben mich nicht nur finanziell, sondern auch auf allen meinen bisherigen Wegen mit viel Liebe, Geduld und einem enormen Zeitaufwand stets unterstützt. Hierfür vielen herzlichen Dank. Ein Dank geht ebenso an meine Geschwister nicht nur fürs Korrekturlesen sondern auch dafür, dass sie mich und mein Leben seit meiner Geburt auf eine sehr schöne Weise begleitet haben und ich mich immer stets auf sie verlassen kann.